

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



**AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSIS EN INFLORESCENCIAS DE
GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN NAYARIT, MÉXICO Y
ALTERNATIVAS DE CONTROL *IN VITRO***

ING. ANTONIO BETANCOURT ARANGURÉ

Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del grado de:
Maestría en Ciencias en el Área de Ciencias Agrícolas

Xalisco, Nayarit; Enero 2019

Xalisco, Nayarit, 23 de enero de 2019

DR. JUAN DIEGO GARCÍA PAREDES
COORDINADOR DEL POSGRADO (CBAP)
P R E S E N T E:

Los suscritos integrantes del Comité Tutorial encargado de asesorar la tesis titulada “**AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSIS EN INFLORESCENCIAS DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN NAYARIT, MÉXICO Y ALTERNATIVAS DE CONTROL *IN VITRO***”, que presenta el Ing. Antonio Betancourt Aranguré, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias con opción terminal en Ciencias Agrícolas, damos nuestra aprobación para que continúe con los trámites correspondientes para la obtención de grado.

Sin más por el momento, nos despedimos de usted enviándole un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E



Dr. Gregorio Luna Esquivel
Director

JHONATHAN CAMBERO C.

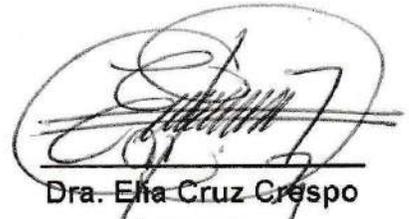
Dr. Octavio Jhonathan Cambero Campos
Co-Director



Dr. Claudio Rios Velasco
Asesor



Dr. Gelacio Alejo Santiago
Asesor



Dra. Eña Cruz Crespo
Asesora



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/004/19.

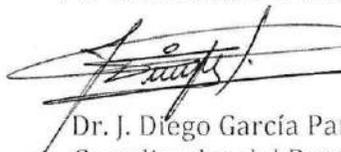
Xalisco, Nayarit; 25 de enero de 2019.

ING. JOSÉ ERNESTO VILLANUEVA TREJO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Con base al oficio de fecha 23 de enero del presente, enviado por los CC. Dr. Gregorio Luna Esquivel, Dr. Octavio Jhonathan Cambero Campos, Dr. Claudio Rios Velasco, Dr. Gelacio Alejo Santiago, y Dra. Elia Cruz Crespo, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha finalizado con los demás requisitos que establece nuestra institución, se autoriza al Ing. Antonio Betancourt Aranguré, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Agrícolas.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Por lo Nuestro a lo Universal"


Dr. J. Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado



C.c.p.- Expediente
& jas

DEDICATORIAS

A mi familia: Padres y hermanos por todo su amor y apoyo incondicional.

A mi esposa e hijos: Por llenarme de amor todos los días y ser el combustible que me mantiene trabajando día a día para brindarles siempre lo mejor.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a través de la beca, la cual me permitió concluir mis estudios de posgrado satisfactoriamente. A la Universidad Autónoma de Nayarit y al Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias por darme la oportunidad de superarme académicamente.

Al proyecto Núm. 266891 apoyado por el “Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Filogenéticos”, por financiar la presente investigación.

Al comité tutorial integrado por: Dr. Gregorio Luna Esquivel, Dr. Octavio Jhonathan Cambero Campos, Dr. Claudio Rios Velasco, Dr. Gelacio Alejo Santiago y Dra. Elia Cruz Crespo. Por todo el esfuerzo entregado a este trabajo y sobre todo por la amistad sincera y el conocimiento brindado hacia mi persona. ¡Muchas Gracias!

Al Dr. Adalberto Gómez Melendrez por el apoyo incondicional durante toda mi carrera académica.

A la Dra. María Fernanda Ruiz Cisneros por su dedicación y apoyo a esta investigación y sobre todo por la amistad y calidez brindada hacia mi persona, así como a todos los integrantes del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., Sede Chihuahua-Campus Cuauhtémoc que de una u otra manera ayudaron e hicieron de esta estancia una aventura inolvidable.

Al personal del Laboratorio de Parasitología Agrícola CEMIC 03.

A los Ings. Carlos Cambero Ayón, Paola Guadalupe Loza Figueroa, Joceline Martínez Mendoza y Adriana Judith Tafoya Ruiz por el apoyo brindado a este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS	iv
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	viii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general.	3
1.1.1. Objetivos específicos.	4
1.2 Hipótesis.	4
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.3 Importancia de la guanábana en el mundo.	5
2.4 Importancia de la guanábana en México y Nayarit.	5
2.5 Guanábana (<i>Annona muricata</i> L.)	6
2.5.1 Fenología floral del cultivo.	6
2.5.2 Descripción y uso del fruto de guanábana.	7
2.6 Generalidades del cultivo.	7
2.7 Antracnosis en guanábana.	8
2.7.1 Antracnosis en inflorescencias de guanábana.	9
2.7.2 Patogénesis de la antracnosis.	9
2.7.3 Ciclo biológico de antracnosis.	11
2.8 Control de hongos fitopatógenos.	12
2.8.1 Métodos preventivos.	12
2.8.2 Control químico de antracnosis.	12
2.8.3 Control biológico de antracnosis.	13

CAPÍTULO III. <i>Colletotrichum theobromicola</i> DELACR. AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSIS EN INFLORESCENCIAS DE GUANÁBANA (<i>Annona muricata</i> L.) EN MÉXICO Y SU ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> CON TRES CEPAS DE <i>Bacillus</i>...	19
CAPÍTULO IV. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS Y FUNGICIDAS CONTRA <i>Colletotrichum theobromicola</i> DELACR, CAUSANTE DE ANTRACNOSIS EN INFLORESCENCIAS DE GUANÁBANA (<i>Annona muricata</i> L.).....	40
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES.....	59
CAPÍTULO VI. LITERATURA CITADA	60

RESUMEN

Antonio Betancourt Arangur 

La producción de guanábana en Nayarit, México se ve limitada por diversas enfermedades fúngicas, sin embargo, antracnosis es considerada la enfermedad de mayor importancia económica, ya que provoca necrosamiento y pérdida de brotes vegetativos tiernos, hojas, inflorescencias y frutos todo el año. Los pétalos de las inflorescencias afectadas muestran pequeñas lesiones de color café a negro, las cuales se agrandan y hunden, causando la caída prematura de pétalos e inclusive la pérdida total de la estructura floral. En el presente estudio se evaluó la incidencia de antracnosis en inflorescencias de guanábana, se identificaron hongos asociados con antracnosis, se determinó el agente causal con pruebas de patogenicidad e identificación molecular, y se llevó a cabo la evaluación antagónica *in vitro* sobre *Colletotrichum theobromicola* Delacr, causante de antracnosis en inflorescencias con nueve cepas de microorganismos (*Bacillus amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus*, *B. subtilis*, *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *Streptomyces* sp. (A7), *S. tubercidicus* (A19), y *S. viridochromogenes* (A27)) y siete fungicidas comerciales Maxtrobyn  (azoxistrobin SC), ExCitrus  (Extracto cítrico + quercetina), Canelys  (Extracto de *Cinnamomum zeylanicum*), Hidrocu  PH (Hidróxido de cobre), Pull75WG  ( xido cuproso), Score  250 EC (Difenoconazol) y Switch  62.5 WG (cyprodinil + fludioxonil). Los resultados mostraron que la antracnosis est  presente en inflorescencias todo el año y puede tener incidencia de 72 % de julio a octubre. Se encontró una correlación de la incidencia de antracnosis con la precipitación pluvial de 0.73 y 0.74, para los municipios de San Blas y Compostela, respectivamente. Se identificaron ocho géneros de hongos (*Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Cladosporium*, *Ovulariopsis*, *Aspergillus*, *Sclerotium* y *Penicillium*) asociados a la antracnosis, de los cuales solo *Colletotrichum* fue patogénico y se identificó molecularmente como *Colletotrichum theobromicola* Delacr. Los nueve antagonistas mostraron actividad antifúngica, donde destacó el género *Streptomyces* al inhibir más del 90 % el crecimiento de *C. theobromicola*. Siendo la cepa A27 la más efectiva (100

%), seguida por las cepas A19 (96.18 %) y A7 (90.4 %). Las cepas de *Trichoderma* inhibieron a *C. theobromicola* en valores superiores al 80.48 %. Mientras que del género *Bacillus*, *B. methylotrophicus* presentó mayor inhibición del crecimiento radial de *C. theobromicola* (74.46 %), seguido por *B. amyloliquefaciens* con 72.83 % y *B. subtilis* con 62.51 %. Los fungicidas Canelys[®], Hidrocu[®] PH y SCORE[®] 250 EC fueron los más eficaces al inhibir por completo (100 %) el crecimiento *in vitro* de *C. theobromicola*. ExCitri[®] y Maxtrobyn[®] fueron los menos efectivos, sin embargo, mostraron porcentajes de inhibición superiores al 47.43 %. Con base en estos resultados, se confirmó un nuevo registro de *C. theobromicola* en guanábana en México, los nueve microorganismos antagonistas y los fungicidas Canelys[®], Hidrocu[®] PH, SCORE[®] 250 EC, Pull75WG[®] y Switch[®] 62.5 WG podrían ser una alternativa potencial para el control biológico y químico de antracnosis en campo, como parte de un esquema de manejo integrado en el cultivo de guanábana.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La guanábana (*Annona muricata* L.) (Magnoliales: Annonaceae), es una de las especies de anonáceas más cultivada en México, con 3,527.43 ha y un rendimiento promedio de 10 t ha⁻¹. Nayarit es el principal estado productor a nivel nacional, responsable del 75.6 % correspondiente a una producción de 21,810.86 t (SIAP, 2017). La guanábana es importante en la dieta humana por sus aportes calóricos, carbohidratos, grasa, proteína, calcio, potasio, hierro y vitamina C (Ramírez y Pacheco, 2011). Razón por la cual se usa en la industria alimentaria para helados, refrescos, yogurt y vino (Bolsher y Cordero, 2003; Bobadilla *et al.*, 2005; Okigbo y Obire, 2009; Hernández *et al.*, 2014a; CONABIO, 2017).

Además, se ha demostrado que sus aceites esenciales tienen propiedades medicinales e insecticidas. Sin embargo, la producción de este frutal al igual que la mayoría de los cultivos agrícolas, se ve limitada debido a enfermedades fúngicas como: pudrición de raíces causada por *Phytophthora* sp., secamiento de ramas por *Diplodia* sp., mancha de las hojas por *Scolecotrichum* sp., y antracnosis en tallos, hojas, brotes, ramas jóvenes, pedúnculos, inflorescencias y frutos causadas por alguna (s) de las 22 especies de *Colletotrichum* (Álvarez *et al.*, 2002; Weir *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2014b).

En relación a éstas, la antracnosis es la enfermedad de mayor importancia económica en *A. muricata*, dado que está presente todo el año, inclusive en forma quiescente en el árbol, reduce la lámina foliar, provoca pérdida de inflorescencias, necrosamiento de frutos y es altamente infectiva en condiciones de humedad relativa alta (≥ 90 %) y en periodos de precipitación (Rondón, 1999; Villanueva *et al.*, 2006; Andrades *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2014a). Por lo que, a mayor precipitación pluvial, mayor será la severidad (94-97 %) (Andrades *et al.*, 2009). Esta enfermedad también afecta a otros frutales como: mango (*Mangifera indica* L.), aguacate (*Persea americana* Mill.), limón (*Citrus x aurantifolia*), papaya (*Carica papaya* L.) y manzano

(*Malus domestica* Borkh.) (Guevara *et al.*, 2004; Carrillo *et al.*, 2005; Arango *et al.*, 2008; Barquero *et al.*, 2013; Trinidad *et al.*, 2017).

Los pétalos de las inflorescencias afectadas por *Colletotrichum* spp. muestran pequeñas lesiones de color café oscuro, las cuales se agrandan y hunden tornándose negras (acérvulos), causando su caída prematura y por ende la pérdida total de la estructura floral (Álvarez *et al.*, 2002; Hernández, 2013; Hernández *et al.*, 2014b). La antracnosis causada por *C. gloeosporioides* puede disminuir hasta en 90 % el rendimiento de guanábana (Pinto *et al.*, 2005). Los daños causados por hongos fitopatógenos establecen la necesidad de desarrollar fungicidas más eficientes y amigables con el ambiente, por lo que el desarrollo de nuevos métodos para su control sigue siendo prioridad (Juárez *et al.*, 2010). Entre las alternativas que han mostrado potencial en el control de enfermedades se encuentra el uso de microorganismos antagonistas como agentes de control biológico (Carrillo *et al.*, 2005).

Estos microorganismos han sido evaluados contra *Colletotrichum* spp. en diversos frutales como manzana, papaya, aguacate y mango (Guevara *et al.*, 2004; Carrillo *et al.*, 2005; Rondón *et al.*, 2006; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2014). Dentro de estos microorganismos con potencial antifúngico, destacan las bacterias del género *Bacillus* debido a la producción de compuestos antimicrobianos y enzimas líticas, entre otros atributos (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2014). El género *Trichoderma* es uno de los antagonistas más estudiado para el control de hongos fitopatógenos como son: *Moniliophthora*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Fusarium*, *Lasioidiplodia*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus* (Rodríguez y Veneros 2011; Landero *et al.*, 2016; Rios-Velasco *et al.*, 2016; Tenorio y Mollinedo, 2016).

La importancia del género *Streptomyces* radica en la capacidad de producir moléculas con aplicaciones en medicina, agricultura y veterinaria (Evangelista *et al.*, 2017). La cualidad más importante de *Streptomyces* es la habilidad para producir metabolitos secundarios bioactivos, especialmente antibióticos y otras moléculas bioactivas; de los más de 10,000 compuestos catalogados, poco más de 7,600

proviene de especies del género *Streptomyces* (Bérdy, 2005; De Lima *et al.*, 2012). Se ha estudiado la actividad antagónica del género *Streptomyces* en hongos y bacterias como: *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium* y *Bacillus* (Ortega *et al.*, 1994; Castillo, 2004; Ezziyani *et al.*, 2004; Chavarría *et al.*, 2005; Rincón *et al.*, 2014; Pérez-Corral *et al.*, 2015; Evangelista *et al.*, 2017). Entre los principales mecanismos de acción por los cuales las cepas de los géneros *Bacillus*, *Trichoderma* y *Streptomyces* evitan el establecimiento y desarrollo de fitopatógenos están: la competencia por el sustrato, micoparasitismo, excreción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas, toxinas, inactivación de enzimas del patógeno y la inducción de la resistencia sistémica de la planta (Infante *et al.*, 2009; Villareal *et al.*, 2017).

Por otra parte, en cultivos como mango, papaya, mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) y chile (*Capsicum annuum* L.) se ha probado una gran variedad de productos comerciales para el control de antracnosis, desde formulaciones a base de moléculas sintéticas y extractos vegetales. Entre los productos que han mostrado potencial en el control de antracnosis se encuentran: difenoconazol, hidróxido de cobre, mancozeb, azoxistrobina, prochloraz, extracto de lavanda (Zavala *et al.*, 2005; Arias y Carrizales, 2007; Santamaría *et al.*, 2011; Gaviria *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2015; Linu y Jisha, 2017; Villacís *et al.*, 2017).

Con base en lo anterior y a la escasa información existente respecto a la antracnosis en inflorescencias de guanábana y su manejo en Nayarit, el objetivo del estudio fue:

1.1 Objetivo general.

Determinar la incidencia de antracnosis en inflorescencias, identificar los microorganismos asociados y patógenos a antracnosis en inflorescencias de guanábana en los municipios de Compostela y San Blas, Nayarit y evaluar alternativas de control *in vitro*.

1.1.1. Objetivos específicos.

Evaluar la incidencia de antracnosis en inflorescencia de guanábana de agosto 2017 a julio 2018 en Compostela y San Blas, Nayarit, México.

Identificar morfológica y molecularmente el agente causal de antracnosis en inflorescencias de guanábana.

Evaluar el antagonismo *in vitro* de los géneros *Bacillus*, *Trichoderma* y *Streptomyces* contra el agente causal de antracnosis en inflorescencias de guanábana.

Evaluar el efecto *in vitro* de siete fungicidas comerciales para el control de antracnosis.

1.2 Hipótesis.

La antracnosis en inflorescencias de guanábana estará presente todo el año, registrándose mayor incidencia en el periodo húmedo.

La antracnosis en inflorescencias de guanábana en Nayarit, es causada por al menos una especie del género *Colletotrichum*.

Al menos un microorganismo antagonista inhibirá en 70 % el crecimiento *in vitro* del agente causal de antracnosis en inflorescencias de guanábana.

Al menos un fungicida comercial inhibirá en 100 % el crecimiento *in vitro* del agente causal de antracnosis en inflorescencias de guanábana.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.3 Importancia de la guanábana en el mundo.

La guanábana es una especie de distribución tropical en altitudes de 0 a 900 m. Se distribuye mundialmente en las regiones del caribe (Bermudas, Bahamas, Cuba, República Dominicana, St. Vincent, Granada), Centroamérica (Costa Rica), Sudamérica (Colombia, Venezuela, Brasil), y en países como; Vietnam, Australia, Nueva Zelanda, África, el sureste de China, en las islas del Pacífico y el sur de México (Hernández *et al.*, 2013).

En el panorama mundial del cultivo de guanábana destaca el continente americano siendo México, Brasil, Venezuela, Nicaragua, Colombia, Costa Rica y Perú los principales productores, aunque se conoce que el cultivo se ha extendido hasta Europa, Asia, África y Australia, los principales exportadores de pulpa son México, Brasil y Perú, donde los importadores más importantes de pulpa son Estados Unidos y España (Álvarez *et al.*, 2002; Benavides, 2004; Yamarte *et al.*, 2004; Andrades *et al.*, 2009; Braga, 2014; Costa *et al.*, 2016).

2.4 Importancia de la guanábana en México y Nayarit.

En México el cultivo de la guanábana es la actividad de mayor importancia en anonáceas. Para el 2017 el país contaba con una superficie plantada de 3527.43 ha con un volumen de producción de 28,853.66 t y un valor de producción de 246 millones de pesos. El rendimiento promedio fue de 10 t ha⁻¹ y el precio rural de \$ 8,531.45 t. Entre los Estados productores más importantes se encuentran Nayarit con 2,529.94, Colima con 380.69, Michoacán con 241, Guerrero con 179, Veracruz con 83.5 y Puebla con 49 ha, respectivamente (SIAP, 2017).

Para el 2017 Nayarit contaba con una superficie plantada de 2,529.94 ha con un volumen de producción de 21,810.86 t y un valor de producción de \$ 199.6 millones. El rendimiento promedio fue de 10.4 t ha⁻¹ y el precio rural de \$ 9,152.53 t. Destacando

el municipio de Compostela con 2,445 ha seguido de San Blas con 52.4, Bahía de Banderas con 14, Tepic con 12 y Xalisco con 6.54 ha, respectivamente (SIAP, 2017).

2.5 Guanábana (*Annona muricata* L.)

La familia Annonaceae comprende 130 géneros y aproximadamente 2,300 especies, dentro de esta familia, los cuatro géneros de mayor importancia económica, por su calidad frutícola y potencial farmacéutico, son *Annona*, *Rollinea*, *Uvaria* y *Asimina*. El género *Annona* comprende alrededor de 120 especies de clima tropical y subtropical (Hernández *et al.*, 2014a). Siendo *A. squamosa*, *A. cherimola* y *A. muricata* las más importantes a nivel comercial (Castro, 2007). De acuerdo al Sistema Integrado de Información Taxonómica (SIIT)-CONABIO actualmente se han aceptado para México 13 géneros y 37 especies de la familia Annonaceae (Andrés y Andrés, 2011).

2.5.1 Fenología floral del cultivo.

De acuerdo con Yamarte *et al.* (2004) la fenología floral de la guanábana, se describe a continuación.

Estado I: yema floral incipiente < 1 mm de longitud, redondeada a los 15 d. Estado II: botón floral de 1 a 5 mm de longitud, con pedúnculo definido (15 d). Estado III: botón floral de 5 a 10 mm de longitud, cáliz y pétalos pubescentes y sedosos definidos (12 d). Estado IV: botón floral de 10 > 20 mm de longitud, cáliz y pétalos definidos, color verde intenso (9 d). Estado V: flor >20 mm de longitud, pétalos de color amarillo-verdoso (4 d). Estado VI: antesis flor semiabierta, con pétalos de tonalidad opaca (amarillento), corrugados, con apertura floral en la punta o borde distal de los pétalos (4 d). Estado VII: flor abierta con su primer juego de pétalos proyectándose hacia fuera, de color amarillo crema (4 d). Estado VIII: desprendimiento de los pétalos externos e internos (flor desnuda) (28 d). Estado IX: erizamiento o frutillo (98 d).

Las inflorescencias de esta especie se abren al amanecer, cuando las anteras están iniciando la expulsión de polen; los pétalos externos caen algunas horas después, y los internos duran unos días más o a veces caen juntos. La floración es

continúa durante el año. Esta especie también tiene una polinización natural ineficiente y con frecuencia produce frutos deformes o asimétricos; por lo tanto, la práctica de la polinización asistida tiene gran importancia en el manejo de huertos (Hernández *et al.*, 2013).

2.5.2 Descripción y uso del fruto de guanábana.

La guanábana produce frutos ovalados, cónicos o en forma acorazonada, de color verde oscuro a verde claro cuando están maduros. La cáscara es delgada, el fruto es carnoso, tiene protuberancias consideradas popularmente como “espinas”. Frutos grandes de 0.9 a 10 kg. La pulpa es blanca, algodonosa, fibrosa y el jugo se asemeja al de la chirimoya. El sabor es más ácido y menos dulce que el de chirimoya. Tiene 127 a 170 semillas. Las semillas son tóxicas, el tamaño varía entre 1 cm y 2 cm de longitud, de color negro poco después de poscosecha, y cambian a un color marrón oscuro más tarde (Andrés y Andrés, 2011). La fruta se puede consumir fresca, cocida o asada para postre cuando está completamente madura, o mezclada con leche o helado como bebida o yogurt. El concentrado de la pulpa con azúcar se utiliza para hacer conservas, jaleas, mermeladas, gelatina, refrescos, néctar o jarabes (Boshler y Cordero, 2003).

2.6 Generalidades del cultivo.

El árbol presenta una altura hasta de 6 m y diámetro de 15 cm, la corteza externa es de color castaña, un poco liza y la parte interna es de color rosado y sin sabor. El follaje es siempre verde con características aromáticas y gustativas muy agradables. Las hojas son alternas oblongas u ovaladas, de punta corta en ambos extremos, ligeramente gruesas y de color verde lustroso en el haz, el envés es de color verde pálido con diminutos orificios redondos que despiden un olor fuerte al estrujarse (Benavides, 2004).

Se desarrolla favorablemente en zonas donde las temperaturas oscilan entre 21 y 30 °C (Rodríguez *et al.*, 2010; IIFT, 2011). Esta especie se adapta a una amplia gama de suelos, con diferentes niveles de profundidad y textura; desde los francos, franco

arcilloso, franco limoso y franco arenoso (INIAP, 2018). Las plantaciones existentes en México se han establecido a partir de árboles provenientes de semilla, sistema no recomendable ya que las plantas son diferentes genéticamente y la mayoría se caracterizan por presentar un período juvenil largo, floración irregular y frutos de mala calidad (Becerra *et al.*, 2015). Las semillas se deben tomar de frutos completamente maduros de plantas de buena producción y en buenas condiciones sanitarias (Boshler y Cordero, 2003). Es una especie tolerante a la sequía y la producción es de temporada, sin embargo, un manejo tecnificado del cultivo perseguirá una producción continua a través del año (INIAP, 2018).

En anonáceas se han adoptado dos sistemas principales de formación: en copa abierta y en eje central. Los cuales permiten tener una mayor densidad de siembra y árboles de menor altura, facilitando las labores de manejo. La poda de mantenimiento conserva el equilibrio de la estructura del árbol mediante la eliminación de brotes que crezcan de manera vertical y ramas que se entrecrucen o se dirijan hacia el suelo. Es necesario después de cada cosecha, realizar una poda sanitaria para eliminar ramas y frutos dañados o con problemas fitosanitarios (Guerrero y Fischer, 2007). Otras podas posteriores solo se hacen por motivos sanitarios, ya que una copa abierta y ventilada, sin exceso de humedad, es menos afectada por la antracnosis (Boshler y Cordero, 2003).

2.7 Antracnosis en guanábana.

La antracnosis es causada por *Colletotrichum*, un hongo que ataca hojas, ramas, inflorescencias y frutos, produciendo la podredumbre negra del fruto, muy común en la época de lluvias (Boshler y Cordero, 2003). El síntoma de esta enfermedad consiste en una necrosis que se presenta en hojas, por lo general circular, de color oscura, que puede o no estar limitada por las nervaduras. Estas lesiones frecuentemente se unen para formar grandes extensiones atizonadas (Nava *et al.*, 2000).

En el caso de guanábana, las pérdidas por enfermedades se presentan en campo (precosecha) al disminuir las plantas y sus productos (frutos), así como durante el almacenamiento de los frutos (poscosecha). Varias enfermedades afectan a la guanábana, sin embargo, destaca la antracnosis, la cual requiere de un manejo especial para que no disminuya el rendimiento y se garantice la comercialización de la fruta (Hernández *et al.*, 2013). Se han reportado especies de *Colletotrichum* como agentes causantes de antracnosis en cultivos como; Chirimoya, limón, mango, aguacate, banana, papaya, carambola, manzana, entre otros (Villanueva *et al.*, 2006; Guillen *et al.*, 2007; Arango *et al.*, 2008; Villanueva *et al.*, 2008; Huerta *et al.*, 2009; Zakaria *et al.*, 2009; Barquero *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2014).

2.7.1 Antracnosis en inflorescencias de guanábana.

Los pétalos de las inflorescencias afectadas muestran pequeñas lesiones de color café oscuro. Posteriormente las lesiones se agrandan y hunden con rapidez, tornándose negras. Cuando hay alta humedad relativa puede observarse una coloración rosa salmón en el área necrosada; efecto originado por las masas de conidios producidas por el hongo que se encuentra infectando los tejidos. Estas manchas provocan la caída prematura de pétalos, lo que afecta el amarre del fruto y la polinización, pueden presentarse lesiones en el pedúnculo, causando la pérdida de toda la estructura floral (Álvarez *et al.*, 2002; Hernández, 2013).

2.7.2 Patogénesis de la antracnosis.

De acuerdo con Villanueva *et al.* (2006), la patogénesis de la antracnosis se da de la siguiente manera:

Preinfección: La patogénesis se inicia con la germinación de los conidios 6 a 9 h después de la inoculación. Los conidios germinan sobre la superficie, la adhesión de los conidios en la superficie del hospedante podría estar directamente relacionada con la naturaleza de las ceras epicuticulares, tales ceras podrían favorecer la germinación. El proceso de germinación involucra la formación del tubo germinativo, emitido en uno o ambos extremos del conidio. En los extremos de los tubos

germinativos se forma un apresorio globoso o clavado 12-24 h después de la inoculación, que se tornan café a las 24 h. Frecuentemente se observa la producción de polifenoles café o castaño en las células epidermales que tienen contacto con los conidios (Villanueva *et al.*, 2006).

Infección: La penetración del hongo es directa a través de una punta de penetración desarrollada en la base del apresorio. La penetración tiene lugar en las células epidermales y en las células de los tricomas 24-48 h después de la inoculación. Esto demuestra que la susceptibilidad de variedades de anonáceas al hongo puede estar asociada con elevadas cantidades de tricomas, ya que estas estructuras no evitan que el hongo penetra al fruto (Villanueva *et al.*, 2006).

Colonización: Puede o no observarse la fase de latencia del hongo en la etapa de apresorio. La colonización del hongo es inter e intracelular y avanza de las células epidermales y tricomas al mesocarpio. En los tricomas se observa como la hifa del hongo crece hacia la célula basal y de ésta al parénquima. En las células epidermales se induce la producción de polifenoles al contacto de los conidios con la cutícula sobre la pared de las células, y también cuando la hifa del hongo penetra al citoplasma. A las 48-72 h las células dispuestas más hacia la superficie del fruto colapsan. Después, se observan los primeros síntomas macroscópicos: lesiones necróticas café o café oscuro, con bordes delimitados, hundidas, típicas de antracnosis y en ellas se producen conidios y conidióforos cortos libres que constituyen una fuente de inóculo secundario (Villanueva *et al.*, 2006).

Conforme los tejidos son colonizados por el hongo, los polifenoles rojos y guindas se metabolizan quedando los primeros dispuestos en las paredes celulares, por lo que las alteraciones son más evidentes en la zona dañada; en contraste, los guindas se tornan café y permanecen en el citoplasma. Es probable que la alteración metabólica de los compuestos fenólicos ocasione la muerte celular, y ésta, junto con los polifenoles, sean los responsables del color y del límite de la lesión. En infecciones más desarrolladas que alcanzan la epidermis interna del mesocarpio, se induce

hiperplasia celular con la diferenciación de abundantes esclereidas y células taníferas. En este estado de desarrollo de la lesión (72 h) se observa que el hongo establecido en la superficie produce un estroma micelial, del cual se desarrolla el acérvulo (Villanueva *et al.*, 2006).

Los acérvulos son subcuticulares y subepidermales y su erupción se lleva a cabo por setas de 4-9 septos que producen una gran cantidad de conidios una vez emergidas, pero la mayor producción de conidios ocurre en conidióforos cortos acervulares embebidos en masas gelatinosas anaranjadas. Así, el ciclo de la enfermedad por *C. fragariae* se completa en 72 h. La producción de inóculo secundario es mucho más rápida que la de *C. gloeosporioides*. La producción excesiva de nueva fuente de inóculo por *C. fragariae* puede aumentar significativamente el progreso de la enfermedad en campo cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables para la infección (Villanueva *et al.*, 2006).

2.7.3 Ciclo biológico de antracnosis.

La antracnosis se presenta con mayor severidad durante el período de lluvias, temperaturas máximas de 31 °C y mínimas de 24 °C y con valores de humedad relativa superiores al 90 %. En condiciones del trópico seco, la lluvia es el factor más importante que se relaciona con la incidencia y severidad de la enfermedad. Los conidios son la fuente principal de inóculo, estos se adhieren a las células epidermales y tricomas, los conidios son liberados solamente cuando el acérvulo o la masa de conidios está en contacto con el agua, ya que tanto las gotas de lluvia como del rocío los salpica y dispersa. También pueden ser diseminados por insectos o herramientas de cultivo (Orozco *et al.*, 2006).

La infección del hongo se lleva a cabo mediante la penetración directa en hojas, brotes, frutos e inflorescencias, en donde el micelio crece intercelularmente y produce colapso y muerte de los tejidos. Tiene un período de incubación muy corto; después de la infección, los primeros síntomas pueden observarse en 3 a 5 d. En las áreas

afectadas se pueden observar masas de conidios de color rosa que son la nueva fuente de inóculo (Orozco *et al.*, 2006).

2.8 Control de hongos fitopatógenos.

El control de hongos fitopatógenos es de gran importancia económica, ya que estos reducen la cantidad y la calidad del producto, durante y después de la cosecha. Los continuos daños económicos causados por hongos establecen la necesidad persistente de desarrollar fungicidas más eficientes y amigables con el ambiente, por lo que la búsqueda y desarrollo de nuevos métodos para su control sigue siendo un tema actual y necesario (Juárez *et al.*, 2010).

2.8.1 Métodos preventivos.

Consiste en mantener el cultivo sano con base en prácticas culturales preventivas, como selección de materiales tolerantes o resistentes, cuarentenas y saneamiento del cultivo, proporcionando a esté los requerimientos necesarios para su óptimo desarrollo (Becerra y Rosas, 2015).

2.8.2 Control químico de antracnosis.

En el caso de guanábana, en México no se tienen agroquímicos registrados para guanábana por la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) (COFEPRIS, 2018). Aun así, se emplean agroquímicos que han resultado eficaces en otros cultivos. Se controla con la poda y quema de las partes afectadas, seguida por aspersiones periódicas de fungicidas carbamatos o a base de cobre (Boshler y Cordero, 2003). En cultivos como mango, papaya, mora de castilla y chile se han probado una gran variedad de productos comerciales para el control de antracnosis, desde formulaciones a base de microorganismos hasta moléculas sintéticas y extractos vegetales, entre los productos que han mostrado potencial en el control de antracnosis se encuentran: difenoconazol, hidróxido de cobre, mancozeb azoxistrobina, prochloraz, extracto de lavanda (Zavala *et al.*, 2005; Arias y Carrizales, 2007; Santamaría *et al.*, 2011; Gaviria *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2015; Linu y Jisha, 2017; Villacís *et al.*, 2017).

Gaviria *et al.* (2013), obtuvieron 100 % de inhibición *in vitro* de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* con los fungicidas Score 250[®] EC (difenoconazol) e Kocide[®] 101 (hidróxido de cobre) en sus tres dosis, para Amistar[®] 50 WG (azoxystrobin) los resultados variaron de 38.75 a 70 %. Linu y Jisha (2017) evaluaron tres fungicidas *in vitro* para el control de *C. capsici* en Chile, los fungicidas evaluados fueron carbendazim (0.05 %), mancozeb (0.2 %) y azoxystrobin (0.1 %), los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición fueron 64.12, 73.47 y 62.21 %. En papaya se evaluó la sensibilidad *in vivo* e *in vitro* de *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos benomilo, imazalil, procloraz, azoxystrobin, metil kresoxim donde procloraz resultó ser el mejor al obtener una severidad y efectividad promedio de 1.7 y 96.5 %, respectivamente, para azoxystrobin los porcentajes promedio fueron de 20.3 y 59.8 % (Zavala *et al.*, 2005).

Azoxistrobina + ciproconazole en dosis de 50 g/100 L logró controlar la antracnosis (*C. gloeosporioides*) por 20 d con incidencia por abajo del 25 % en frutos postcosecha de mango (Arias y Carrizales, 2007). En un estudio realizado por Pérez *et al.* (2015) para el control de antracnosis en *Sansevieria trifasciata* var. Hahnii. causada por *C. sansevieriae*, azoxistrobina mostró un 100 % de protección de las hojas, registrando también un 0 % de incidencia a los siete y once días de evaluación. En frutos de papaya maradol, Azoxystrobin mostró 87.5 % de efectividad para *C. gloeosporioides* y 3.3 % para *C. dematium* esto demuestra que la especie del patógeno juega un papel importante a considerar al momento de establecer un manejo integrado del cultivo (Santamaría *et al.*, 2017).

2.8.3 Control biológico de antracnosis.

Se entiende por antagonismo a la estrecha asociación de dos o más especies que viven juntas en simbiosis, donde estas especies sufren efectos adversos (Rodríguez y Arredondo, 2007). Entre las alternativas que han mostrado potencial en el control de enfermedades destaca el uso de microorganismos antagonistas (hongos y bacterias) como agentes de control biológico (Carrillo *et al.*, 2005). La eficacia de

estos microorganismos contra *Colletotrichum* spp. ha sido probada en diversos frutales como manzana, papaya, aguacate y mango (Guevara *et al.*, 2004; Carrillo *et al.*, 2005; Rondón *et al.*, 2006; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2014). Dentro de estos microorganismos con potencial antifúngico, destacan los géneros *Bacillus*, *Trichoderma* y *Streptomyces* debido a la producción de compuestos antimicrobianos, metabolitos secundarios bioactivos, enzimas líticas, la competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, entre otros (De Lima *et al.*, 2012; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2014; Infante *et al.*, 2009).

El género *Bacillus* pertenece al Reino Bacteria; Filo Firmicutes; Clase Bacilli; Orden Bacillales y Familia Bacillaceae (Maughan y Van der Auwera, 2011). Actualmente, el género incluye más de 336 especies (Villareal *et al.*, 2017). Algunas especies del género *Bacillus* han demostrado tener actividad antagónica contra diversos microorganismos patógenos de cultivos, tales como mango, papaya, mora, entre otros (Hiradate *et al.*, 2002; Guevara *et al.*, 2004; Carrillo *et al.*, 2005). Entre los principales mecanismos de acción por los cuales evitan el establecimiento y desarrollo de fitopatógenos están: la excreción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas, toxinas y la inducción de la resistencia sistémica de la planta (Villareal *et al.*, 2017).

Algunas cepas del género *Bacillus* producen lipopéptidos (surfactina, iturinas y fengicinas) con actividad antifúngica (Yun Cao *et al.*, 2012; Qinggang Guo *et al.*, 2014; Sánchez, 2016). En un estudio realizado por Kim *et al.* (2010), la cepa CMB32 de *B. subtilis* confrontada contra *C. gloeosporioides* produjo tres lipopéptidos antifúngicos: iturina A, fengicina y surfactina A., los cuales juegan un papel importante en la inhibición del crecimiento de hongos patógenos. En el mismo sentido Hiradate *et al.* (2002) encontraron que la cepa RC-2 de *B. amyloliquefaciens* produjo siete compuestos antifúngicos (Iturinas A) secretados en el filtrado de cultivo, responsables de la inhibición del desarrollo de antracnosis *in situ* en mora causada por *C. dematium*. Carrillo *et al.* (2005), evaluaron la efectividad de *B. subtilis*, *Rhodotorula minuta* y su combinación, para el control de antracnosis en mango. En forma individual *B. subtilis* (79.3 %) presentó un mejor control de la severidad de antracnosis en comparación con

el fungicida químico comercial benomil (30.5 %). Las aplicaciones de *R. minuta* + *B. subtilis* empleadas en la huerta de mango Kent, redujeron la severidad de la antracnosis en 86.7 %. Guevara *et al.* (2004) obtuvieron una inhibición *in vitro* de *B. firmus* de 75 % sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* aislado de papaya maradol roja.

Las especies del género *Trichoderma* representan un grupo de hongos filamentosos que pertenecen al Reino Mycetozoa (Fungi), división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Hyphales (Moniliales) y familia Moniliaceae (Argumedo *et al.*, 2009). La importancia de este grupo de hongos radica en el control de hongos fitopatógenos ya que posee propiedades micoparasíticas y antibióticas, por lo que algunas especies son excelentes agentes de control biológico de hongos fitopatógenos para diferentes cultivos como mango, papaya, manzana, cacao, cítricos, ajo y cacahuate (Avila *et al.* 2006; Rojo *et al.* 2007; Rodríguez y Veneros, 2011; Lima *et al.*, 2016; Peláez *et al.*, 2016; López *et al.*, 2017; Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017).

Se considera que el género *Trichoderma* es uno de los antagonistas más estudiado para el control de hongos fitopatógenos como son: *Moniliophthora*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus* (Rodríguez y Veneros 2011; Rios-Velasco *et al.*, 2016; Tenorio y Mollinedo, 2016). Los mecanismos de acción que le permiten a *Trichoderma* el control de patógenos son: la competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, penetración y resistencia inducida (Infante *et al.*, 2009).

Peláez *et al.* (2016) evaluaron *in vitro* la capacidad de *T. asperellum* para inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides* causante de antracnosis en mango, el cual mostró un 91 % de inhibición, observando un sobrecrecimiento en el hongo fitopatógeno, evidenciando la capacidad de *Trichoderma* como alternativa promisorio de control biológico contra el agente causal de la antracnosis. De la Cruz *et al.* (2018),

encontraron que, *T. harzianum* inhibió (9.5 %), *T. asperellum* (22.5 %) y *T. longibrachiatum* (21.9 %), para *C. gloeosporioides in vitro*.

Ghosh y Chakraborty (2012), quienes evaluaron cepas de *T. viride* para el control *in vitro* de *C. gloeosporioides* en *Rauwolfia serpentina* encontraron que las esporas de *Trichoderma* se adhieren a las paredes de *Colletotrichum* y las contraen. Vargas *et al.* (2012) evaluaron la efectividad antagónica *in vitro* de 27 cepas de *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* y *T. harzianum* contra *Colletotrichum* sp., de las cuales, nueve mostraron porcentaje de inhibición superior al 70 % destacando las cepas de *T. asperellum*.

Cepas de *T. asperellum* fueron evaluadas por Sanmartín *et al.* (2012) para el control *in vitro* de *C. gloeosporioides*, quienes encontraron que todas las cepas de *T. asperellum* presentaron un alto grado de antagonismo, y que el antagonismo total sobre *C. gloeosporioides* está correlacionado con la actividad antagónica debido a compuestos volátiles, a metabolitos secundarios solubles y al crecimiento asociado a actividad quitinasa.

En un estudio realizado por Rodríguez y Veneros (2011), encontraron que las hifas de *T. harzianum* cubrieron y degradaron las hifas de los patógenos (*R. nigricans*, *C. gloeosporioides*, *A. alternata*, *S. lycopersici*, *F. oxysporum*, *L. thebromae*, causantes de enfermedades postcosecha en frutos almacenados de *C. papaya*. y determinaron que el mecanismo de acción de *T. harzianum* como biocontrolador sobre los hongos postcosecha aislados de frutos postcosecha de papaya amarilla fue el de micoparasitismo. El rápido crecimiento de *Trichoderma* y la actividad de enzimas líticas como quitinasas, endoglucanasas y exoglucanasas le permite a *Trichoderma* posicionarse como un agente potencial de control biológico de *Colletotrichum* (Hoyos *et al.*, 2008; Rodríguez y Veneros 2011; Sanmartín *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 2012).

El género *Streptomyces* pertenece a la familia Streptomycetaceae. La familia Streptomycetaceae se encuentra en el filo Actinobacteria y en el orden

Actinomycetales dentro de la clase Actinobacteria, el género *Streptomyces* es el único miembro de esta familia. *Streptomyces* es el género más grande de actino-bacterias. Cerca de 500 especies del género *Streptomyces* han sido descritas (Hasani *et al.*, 2014). Estas bacterias se describen como microorganismos Gram positivos, en su mayoría aerobias, algunos grupos presentan desarrollo y crecimiento unicelular, aunque un buen número de especies presentan crecimiento micelial filamentoso formado por hifas enramadas no septadas (Evangelista *et al.*, 2017).

La importancia del género *Streptomyces* radica en la capacidad de producir moléculas con aplicaciones en medicina, agricultura y veterinaria (Evangelista *et al.*, 2017). La cualidad más importante de *Streptomyces* es la habilidad para producir metabolitos secundarios bioactivos, especialmente antibióticos y otras moléculas bioactivas; de los más de 10,000 compuestos catalogados, poco más de 7,600 provienen de especies del género *Streptomyces* (Bérdy, 2005; De Lima *et al.*, 2012). Se ha estudiado la actividad antagónica del género *Streptomyces* en hongos y bacterias como: *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, *Bacillus* (Ortega *et al.*, 1994; Castillo, 2004; Ezziyani *et al.*, 2004; Chavarría *et al.*, 2005; Rincón *et al.*, 2014; Pérez-Corral *et al.*, 2015; Evangelista *et al.*, 2017).

El género *Streptomyces* ha mostrado cualidades como agente de control biológico contra patógenos, cabe mencionar que las investigaciones realizadas sobre este antagonista están enfocadas principalmente al control de patógenos de suelo (hongos y bacterias) como: *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, *Bacillus* (Ortega *et al.*, 1994; Castillo, 2004; Ezziyani *et al.*, 2004; Chavarría *et al.*, 2005; Rincón *et al.*, 2014; Pérez-Corral *et al.*, 2015; Evangelista *et al.*, 2017). Dávila *et al.* (2013), aislaron y evaluaron el efecto antagonista *in vitro* de *Streptomyces* sp. contra los hongos fitopatógenos *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Colletotrichum* sp., donde el porcentaje de inhibición más alto registrado fue para *Colletotrichum* sp. con 61.57 %.

Atta (2015), encontró que *S. torulosus* produce tunicamicina el cual es un antibiótico de amplio espectro, efectivo *in vitro* contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como contra hongos unicelulares y filamentosos. Además, el género *Streptomyces* se ha reportado que tiene capacidad como promotor de crecimiento, ya que Robles *et al.* (2015) encontraron que este promovió los parámetros de crecimiento vegetativo, particularmente altura de planta, área foliar, longitud de raíz, y biomasa seca foliar y radical en plantas de chile jalapeño, demostrando que no solo funciona como agente de control biológico sino también como biofertilizante.

CAPÍTULO III

Colletotrichum theobromicola* DELACR. AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSIS EN INFLORESCENCIAS DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN MÉXICO Y SU ANTAGONISMO *In Vitro* CON TRES CEPAS DE *Bacillus

Antonio Betancourt Aranguré¹, Jhonathan Cambero Campos², Claudio Rios Velasco³, Gelacio Alejo Santiago², Carlos Bryan Cambero Ayón¹, Gregorio Luna Esquivel².

¹Ing. Agrónomo. Programa de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco Nayarit, México. luzbeltz@gmail.com, camberoayon1@gmail.com.

²Dr.Sc. Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco Nayarit, México. jhony695@gmail.com, gelacioalejo@hotmail.com, gollole@hotmail.com.

³Dr. Sc. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Unidad Cuauhtémoc, Chihuahua. Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. claudio.rios@ciad.mx.

Resumen. En el presente estudio se evaluó la incidencia de antracnosis en inflorescencias, identificación de hongos asociados, pruebas de patogenicidad y se identificó molecularmente el agente causal de antracnosis. Los resultados mostraron que antracnosis está presente en inflorescencias durante todo el año y puede tener incidencia de 72 % de julio a octubre. Se encontró correlación de la incidencia de antracnosis con precipitación de 0.73 y 0.74 para San Blas y Compostela, respectivamente. Se identificó un total de ocho géneros de hongos (*Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Cladosporium*, *Ovulariopsis*, *Aspergillus*, *Sclerotium* y *Penicillium*), de los cuales solo *Colletotrichum* fue patogénico y se identificó molecularmente como *Colletotrichum theobromicola* Delacr., que representa un nuevo reporte en guanábana para México. Adicionalmente, se evaluó el antagonismo *in vitro* de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus* y *B. subtilis* contra *C. theobromicola*. *Bacillus methylotrophicus* presentó mayor inhibición del crecimiento radial (PICR) de *C. theobromicola* (74.46 %), seguido por *B. amyloliquefaciens* con

72.83 % y *B. subtilis* con 62.51 %. Las tres cepas de *Bacillus* podrían ser consideradas como potenciales en el control de antracnosis en inflorescencias de guanábana.

Términos para indexación: Nayarit, fitopatógeno, antagonista, control biológico, hongos.

Colletotrichum theobromicola Delacr. causal agent of anthracnose in soursop inflorescences (*Annona muricata* L.) and its *in vitro* antagonism with three *Bacillus* strains

Abstract. In the present study the incidence of anthracnose in inflorescences was evaluated, identification of associated fungi, pathogenicity tests and the causal agent of anthracnose was molecularly identified. The results showed that anthracnose is present in inflorescences throughout the year and can have an incidence of 72 % from July to October. A correlation of the incidence of anthracnose with precipitation of 0.73 and 0.74 was found in San Blas and Compostela's localities, respectively. A total of eight genera of fungi (*Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Cladosporium*, *Ovulariopsis*, *Aspergillus*, *Sclerotium* and *Penicillium*) were identified, of which only *Colletotrichum* was pathogenic and was identified molecularly as *Colletotrichum theobromicola* Delacr., that represents a new phytosanitary report in soursop for Mexico. Additionally, the *in vitro* antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus* and *B. subtilis* against *C. theobromicola* were evaluated. *Bacillus methylotrophicus* showed a higher percentage of radial growth inhibition (PICR) of *C. theobromicola* (74.46 %), followed by *B. amyloliquefaciens* with 72.83 % and *B. subtilis* with 62.51 %. The three strains of *Bacillus* could be considered as potential in the control of anthracnose in soursop inflorescences.

Index terms: Nayarit, phytopathogen, antagonist, biological control, fungi.

Introducción

La guanábana (*Annona muricata* L.) (Magnoliales: Annonaceae), es una de las especies de anonáceas más cultivada en México, con 3,527.43 ha y un rendimiento promedio de 10 t ha⁻¹. Nayarit es el principal estado productor a nivel nacional, responsable del 75.6 % correspondiente a una producción de 21,810.86 t (SIAP, 2017). La guanábana es importante en la dieta humana por sus aportes calóricos, carbohidratos, grasa, proteína, calcio, potasio, hierro y vitamina C (Ramírez; Pacheco, 2011). Razón por la cual se usa en la industria alimentaria para helados, refrescos, yogurt y vino (Bolsher y Cordero, 2003; Bobadilla *et al.*, 2005; Okigbo y Obire, 2009; Hernández *et al.*, 2014a; CONABIO, 2017). Además, se ha demostrado que sus aceites esenciales tienen propiedades medicinales e insecticidas.

Sin embargo, la producción de este frutal al igual que la mayoría de los cultivos agrícolas, se ve limitada debido a enfermedades fúngicas como: pudrición de raíces causada por *Phytophthora* sp., secamiento de ramas por *Diplodia* sp., mancha de las hojas por *Scolecotrichum* sp., y antracnosis en tallos, hojas, brotes, ramas jóvenes, pedúnculos, inflorescencias y frutos causadas por alguna (s) de las 22 especies de *Colletotrichum* (Álvarez *et al.*, 2002; Weir *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2014b). Dentro de éstas, la antracnosis es la enfermedad de mayor importancia económica en *A. muricata*, dado que está presente todo el año, inclusive en forma quiescente en el árbol, reduce la lámina foliar, provoca pérdida de inflorescencias, necrosamiento de frutos y es altamente infectiva en condiciones de humedad relativa alta (≥ 90 %) y en periodos de precipitación (Rondón, 1999; Villanueva *et al.*, 2006; Andrades *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2014a). Por lo que, a mayor precipitación pluvial, mayor será la severidad (94-97 %; Andrades *et al.*, 2009).

Esta enfermedad también afecta a otros frutales como: mango (*M. indica* L.), aguacate (*Persea americana* Mill.), limón (*Citrus aurantifolia*), papaya (*Carica papaya* L.) y manzano (*Malus domestica* Borkh.) (Guevara *et al.*, 2004; Carrillo *et al.*, 2005; Arango *et al.*, 2008; Barquero *et al.*, 2013; Trinidad *et al.*, 2017). Los pétalos de las

inflorescencias afectadas por *Colletotrichum* spp. muestran pequeñas lesiones de color café oscuro, las cuales se agrandan y hundan tornándose negras (acérvulos), causando su caída prematura y por ende la pérdida total de la estructura floral (Álvarez *et al.*, 2002; Hernández, 2013; Hernández *et al.*, 2014b). La incidencia y los daños económicos causados por esta enfermedad inducen la búsqueda y desarrollo de estrategias eficientes y amigables con el ambiente para su control (Juárez *et al.*, 2010).

Entre las alternativas que han mostrado potencial en el control de enfermedades destaca el uso de microorganismos antagonistas (hongos y bacterias) como agentes de control biológico (Carrillo *et al.*, 2005). La eficacia de estos microorganismos contra *Colletotrichum* spp. ha sido probada en diversos frutales como manzana, papaya, aguacate y mango (Guevara *et al.*, 2004; Carrillo *et al.*, 2005; Rondón *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2014). Dentro de estos microorganismos con potencial antifúngico, donde destacan las bacterias del género *Bacillus* debido a la producción de compuestos antimicrobianos y enzimas líticas, rápido crecimiento (competencia), entre otros atributos (Ruiz *et al.*, 2014).

Con base en lo anterior y a la escasa información existente respecto a la antracnosis en inflorescencias de guanábana y su manejo en Nayarit, el objetivo del estudio fue; evaluar la incidencia de antracnosis en inflorescencias, determinar el agente causal y evaluar el antagonismo *in vitro* de tres cepas de *Bacillus* contra el agente causal de antracnosis en inflorescencias de guanábana en Nayarit, México.

Materiales y métodos

Incidencia de antracnosis en inflorescencias: se evaluó la incidencia de antracnosis en dos huertos de aproximadamente 6 y 4 años de edad, respectivamente, uno localizado en el municipio de Compostela (El Tonino 2) y otro en San Blas (El Rumbadero), Nayarit. La evaluación se realizó una vez por mes (de agosto a diciembre de 2017 y de enero a julio de 2018), se seleccionaron 20 árboles al azar, se registró el número de inflorescencias (desde botón hasta apertura) con antracnosis con respecto

al número total de inflorescencias (aparentemente sanas) por árbol mediante la siguiente fórmula (Andrades *et al.*, 2009):

$$\text{Incidencia (I)} = \frac{\text{No. de inflorescencias enfermas}}{\text{No. total de inflorescencias}} \times 100$$

Localización de los sitios de muestreo: se muestrearon mensualmente cinco huertos comerciales de guanábana (~ 1 ha c/u) durante 6 meses del ciclo 2017: marzo, abril y mayo (periodo seco) y junio, julio y agosto (periodo húmedo); los huertos muestreados se localizan en los municipios de Compostela (3) y San Blas (2), Nayarit, México (Cuadro 1). En cada huerto se recolectaron al azar 10 inflorescencias con síntoma de antracnosis para cada periodo, es decir, se obtuvieron 100 muestras en total de ambos periodos, las muestras con sintomatología característica (manchas necróticas o acérvulos de color naranja) se colocaron en bolsas de papel estraza debidamente rotuladas con fecha y localidad, para su traslado y procesamiento en el Laboratorio de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma de Nayarit (Cemic 03).

Cuadro 1. Huertas de guanábana muestreadas en los municipios de Compostela y San Blas, Nayarit, México durante el ciclo 2017.

Municipio	Ejido	Parcela	Coordenadas	Altitud
Compostela	El Tonino	1	21° 04' 05" N; 105° 12' 51" O	74 m
	El Tonino	2	21° 02' 45" N; 105° 11' 08" O	335 m
	El Tonino	3	21° 03' 29" N; 105° 11' 54" O	217 m
San Blas	Tecuitata	El Fresno	21° 27' 38" N; 105 09' 20" O	382 m
	La Palma	El Rumbadero	21° 31' 50" N; 105° 10' 08" O	183 m

Aislamiento y purificación de hongos: Las inflorescencias con síntomas de antracnosis se lavaron con agua corriente por 1 min y a partir del avance (zona de transición) de la enfermedad, se seccionaron en trozos de 0.5 cm², se sumergieron por 2 min en una solución de NaClO al 2 %; posteriormente se enjuagaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril por 3 min y se dejaron secar a temperatura ambiente. En cada caja de Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) se sembraron por duplicado cinco porciones distribuidas en cada caja. Las cuales fueron selladas con papel parafilm y se incubaron en condiciones controladas (26 ± 2 °C) en ausencia de luz. El crecimiento del hongo se revisó sistemáticamente cada 24 h (Arango *et al.*, 2008). A partir de los crecimientos fúngicos de 7 d de edad se aislaron y subsecuente se purificaron a partir de cultivos monospóricos, los cuales se obtuvieron mediante diluciones seriadas de 1:10, 1:100 y 1:1000 (French y Hebert, 1980). Los aislamientos se conservaron en una incubadora de acero inoxidable Novatech® (modelo EI60-AIA) para las pruebas posteriores.

Pruebas de patogenicidad en inflorescencias de guanábana: Cada uno de los ocho aislados se inoculó de manera individual en 10 inflorescencias aparentemente sanas, donde cada inflorescencia se consideró como una repetición. Las inflorescencias previo a ser inoculadas se lavaron y desinfectaron con NaClO al 2 % por 3 min, se enjuagaron con agua destilada estéril por 3 min y se colocaron de manera individual en bolsas de papel estériles para evitar una contaminación cruzada o externa. La inoculación de las 90 inflorescencias se realizó sin causarles herida de acuerdo con el método descrito por Álvarez *et al.* (2002) con modificaciones. Los inóculos consistieron en discos de PDA con crecimiento micelial y conidios sin cuantificar del patógeno con 7 d de edad y discos en ausencia del patógeno para los testigos.

Las inflorescencias inoculadas fueron cubiertas con algodón húmedo y posteriormente se cubrieron con bolsas de papel estraza (cámara húmeda), ambos estériles, se incubaron bajo condiciones controladas arriba descritas y se revisaron sistemáticamente cada 24 h para la observación de síntomas, se registró el periodo de

incubación del hongo (tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la manifestación de síntomas de antracnosis), micelio abundante y esporulación (masas conidiales). Una vez replicados los síntomas se realizó el re-aislamiento del hongo inoculado a partir de la zona de transición de la antracnosis para verificar bajo el microscopio óptico si el organismo re-aislado correspondía al inoculado (Cen, 2012).

Identificación morfológica de aislados patogénicos: La identificación de los hongos se realizó mediante sus caracteres morfológicos microscópicos tales como esporas y cuerpos fructíferos observados en un microscopio compuesto Leica® (modelo DME 13595XXX) con la ayuda de claves taxonómicas-dicotómicas de Barnett y Hunter (1998) y, hasta cierto grado, por sus características macroscópicas tales como el tipo y color del micelio (Agrios, 1996).

Identificación molecular del aislado patogénico: El ADN genómico (ADNg) se extrajo para el análisis de identidad del hongo causante de la antracnosis de inflorescencias en guanábana, basado en sus caracteres moleculares. Para esto, se recolectó el micelio de 7 d de edad y se maceró en un mortero de porcelana con un amortiguador (200 mM Tris-HCl (pH = 8), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS) a 70 °C (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017). El ADNg obtenido se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y subsecuentemente se usó para amplificar el espaciador transcrito interno (ITS4 e 5) del ADNr, usando los cebadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990).

Las condiciones de amplificación para la PCR incluyeron una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 45 s, y una etapa final de extensión a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se examinaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017). El producto fue secuenciado por Macrogen (Rockville, MD, EUA). La secuencia obtenida se comparó con las bases

de datos del NCBI usando el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para verificar el porcentaje de identidad correspondiente a la especie.

Antagonismo *in vitro*: Una vez identificado el agente causal de la antracosis en inflorescencias de guanábana, se evaluó su antagonismo *in vitro* con cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. methylophilus* y *B. subtilis* (Rios-Velasco *et al.*, 2016). Las bacterias fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fisiología de Poscosecha, Patología Vegetal y Control Biológico del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc, Chihuahua. Las confrontaciones *in vitro* de *Bacillus* spp. vs *Colletotrichum* se realizaron en cajas de Petri de 90 mm de diámetro con PDA (DIBICO®). El efecto antifúngico se determinó por el método de confrontación de cultivos, para lo cual se colocaron las cepas bacterianas (discos de cultivo de 7 mm de diámetro) en los cuatro puntos cardinales de las cajas de Petri conteniendo PDA, y en el centro de las cajas se colocaron discos individuales de cultivo de *Colletotrichum* sp. de 7 d de edad (micelio y conidios sin cuantificar), ambos se colocaron el mismo día.

Diseño experimental: El experimento se realizó por triplicado donde cada repetición constó de 3 cajas de Petri y los testigos positivos consistieron en cajas de Petri con PDA inoculadas con el hongo fitopatógeno en ausencia de las cepas bacterianas. Las cajas se incubaron a 28 °C en ausencia de luz en una incubadora Novatech® (modelo EI60-AIA) y se realizaron mediciones sistemáticas cada 24 h por 12 d, del crecimiento radial del hongo confrontado con las bacterias antagonistas y sus respectivos testigos (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017). El antagonismo *in vitro* de *Bacillus* spp. se determinó mediante la evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno (PICR), empleando la siguiente fórmula: $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$; donde R1 es el crecimiento radial del patógeno testigo y R2 es el crecimiento radial del patógeno en confrontación.

Análisis estadístico: A las variables evaluadas se les aplicó un análisis de varianza y una prueba de separación de medias por Tukey ($\alpha = 0.05$) mediante el programa Statistical Analysis System (Sas Institute Inc., 2009).

Resultados y discusión

Incidencia de antracnosis en inflorescencias: La incidencia de antracnosis en inflorescencias de guanábana fue variable a través del tiempo, la mayor incidencia se observó en el periodo húmedo (junio a octubre de 2017) en ambos municipios, mientras que la menor incidencia se registró en el periodo seco (enero a abril de 2018). Para San Blas fluctuó de 0.64 (periodo seco) a 72.92 % (periodo húmedo), este último fue el porcentaje más alto registrado, mientras que para Compostela fluctuó de 0.55 (periodo seco) a 34.84 % (periodo húmedo). La antracnosis se presentó durante todo el año, incrementándose al iniciar el período húmedo (Figura 1), factor climático que proporcionó las condiciones óptimas para el desarrollo de *Colletotrichum* sp., caso contrario para el periodo seco, donde la escasa o nula precipitación posiblemente mantuvo quiescente al patógeno. Se han reportado infecciones quiescentes por *Colletotrichum* en litchi (*Litchi chinensis* Sonn.), aguacate (*Persea americana* Mill.) y tomate de árbol (*Solanum betacea*, (Cav) Sendt) (Rondón, 1999; Rodríguez *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2015).

Estas variables climáticas están estrechamente relacionadas con la incidencia de antracnosis, en nuestro estudio se encontró una alta correlación para precipitación de 0.73 para San Blas y 0.74 para Compostela (Figura 1). Por lo tanto, a mayor precipitación mayor será la incidencia y severidad de antracnosis en inflorescencias de guanábana en Nayarit, México. La incidencia también podría verse afectada por el relieve de la zona, pues cabe mencionar que estas condiciones son diferentes en ambas localidades, ya que, en Compostela, la huerta se encuentra rodeada de montañas que protegen a los árboles del viento y la brisa del mar, no siendo así para San Blas donde se registró la incidencia más alta que se encuentra directamente frente al mar sin barreras naturales que la protejan. Las temperaturas medias máxima y

mínima registradas fueron de 34 y 24 °C en el periodo húmedo con una precipitación pluvial anual de 1,122 mm para el municipio de San Blas. Mientras que, para El Tonino, Compostela se registraron las mismas temperaturas medias con una precipitación pluvial anual similar de 1,141 mm (Accuweather, 2018).

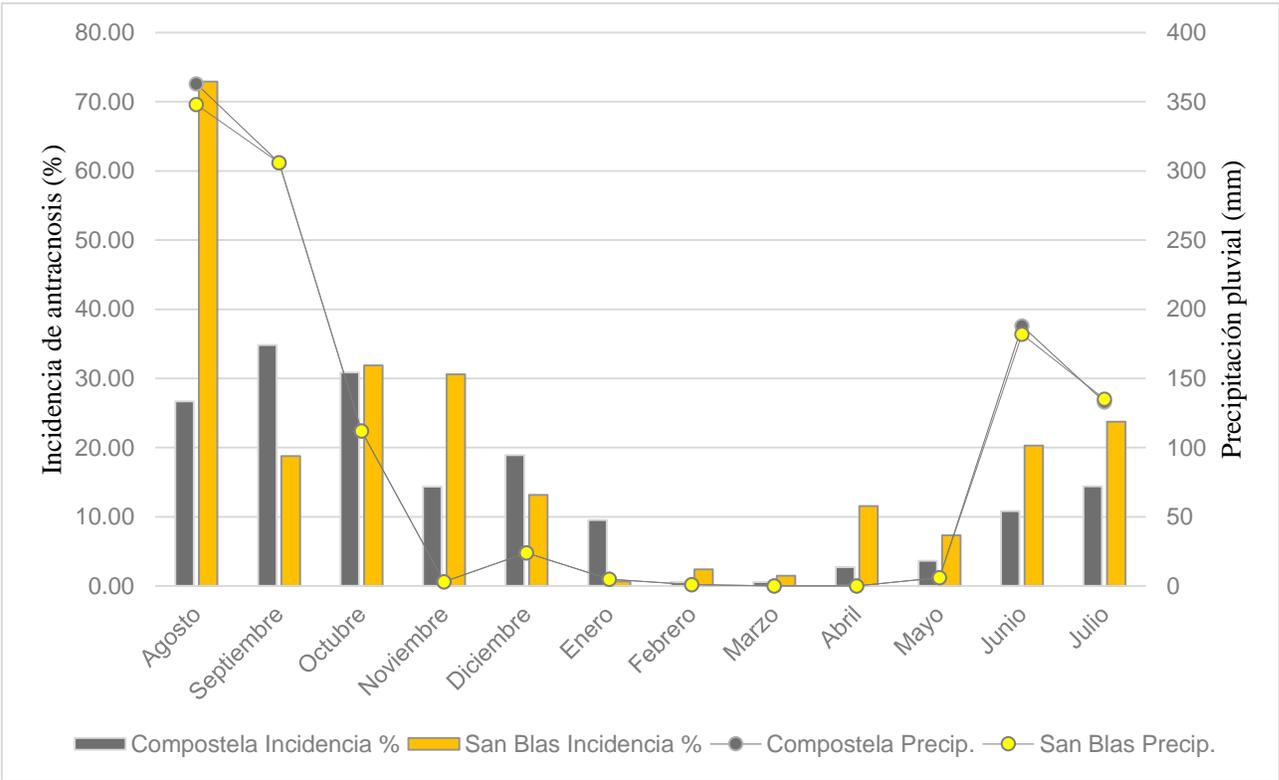


Figura 1. Incidencia de antracnosis (%) en inflorescencias de guanábana y precipitación pluvial (mm) de agosto a diciembre de 2017 y de enero a julio de 2018, en huertos de Compostela y San Blas, Nayarit, México y su precipitación pluvial mensual.

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Rondón (1997) quien demostró que la antracnosis se encuentra presente todo el año, con variaciones en intensidad debido a variaciones climáticas, en especial de la precipitación, variable que presentó las mayores correlaciones con la enfermedad (0.76). El mismo autor menciona que la antracnosis inicia con un crecimiento progresivo que finaliza en un primer pico de infección concentrado y de mayor importancia en cuanto a pérdidas, debido posiblemente a la sincronización con factores favorables, como humedad y

agua disponible, reactivación e incremento del inóculo y de fuentes de infección (frutos y hojas) en la planta; y una reducción drástica de la enfermedad con la disminución de la precipitación, hasta que se inicia el ciclo nuevamente. En papaya, Bogantes y Mora (2013), registraron incidencias de 10 hasta 100 % bajo condiciones ambientales consideradas como favorables para el desarrollo de la enfermedad (temperatura promedio de 24.6 °C y precipitación pluvial anual de 4,380 mm).

Hongos asociados con antracnosis en inflorescencias: Los ocho géneros de hongos identificados asociados a inflorescencias de guanábana son *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Cladosporium*, *Ovulariopsis*, *Aspergillus*, *Sclerotium* y *Penicillium*. En el Cuadro 2 se muestra su procedencia y el periodo en el que se aislaron (húmedo o seco), donde destaca *Colletotrichum* spp. como el más representativo en ambas temporadas, mientras que *Lasiodiplodia* sp. y *Ovulariopsis* sp. solo se encontraron en la temporada húmeda (lluvias). Se ha referido que el complejo de microorganismos patógenos contribuye a que la enfermedad sea más severa en comparación con el efecto que pueda causar un solo patógeno, por ejemplo, *Colletotrichum* sp., se ha asociado con *Fusarium* sp., y *Alternaria* sp. en frutos de mango (Morales y Rodríguez, 2006). En Venezuela, Andrades *et al.* (2009) aislaron e identificaron a *Colletotrichum* y *Fusarium* de frutos de guanábana con síntomas de antracnosis, reportando como el agente causal a *Colletotrichum* spp., y los daños más severos al asociarse con *Fusarium*.

Pruebas de patogenicidad e identificación morfológica y molecular: *Colletotrichum* sp. aislado de El Tonino 2 (Compostela), fue el que logró replicar el síntoma característico de antracnosis al tercer día de inoculado en inflorescencias de guanábana, confirmado por la presencia de masas de conidios en acérvulos de color naranja cerosos, subepidérmicos en el tejido inoculado (Figura 2). Macroscópicamente, las colonias mostraron un color gris a negro con borde blanco y apariencia algodonosa ligeramente levantado al ser crecidos en PDA, mientras que microscópicamente mostraron conidióforos simples, alargados; conidios hialinos, unicelulares, cilíndricos o fusiformes (Barnett y Hunter, 1998; Figura 2).

Cuadro 2. Hongos asociados con antracnosis en inflorescencias de guanábana e identificados a nivel de género en los municipios de Compostela y San Blas, Nayarit, México.

Municipio	Ejido	Parcela	Periodo			
			Húmedo	Seco		
Compostela	El Tonino	1	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum</i>		
			<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>		
			<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Sclerotium</i>		
Compostela	El Tonino	2	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum</i>		
			El Tonino	3	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum</i>
					San Blas	Tecuitata
<i>Colletotrichum</i>	<i>Cladosporium</i>					
<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Colletotrichum</i>					
San Blas	La Palma	El Rumbadero	<i>Ovulariopsis</i>			
			<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>		
			<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>		
			<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i>		

De acuerdo con sus caracteres moleculares el hongo se identificó como: *C. theobromicola* con 99 % de identidad (clave de identidad KC512126.1). Al respecto, Hernández *et al.* (2014b) reportaron al género *Colletotrichum* sp. como el agente causal de antracnosis en guanábana en Veracruz, México. Álvarez *et al.* (2002) reportaron a *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* como agentes causales de antracnosis en guanábana en el Valle de Cauca, Colombia. Mientras que Villanueva *et al.* (2008) reportaron a *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. orbiculare* como agentes causales de antracnosis en frutos de chirimoya (*Annona cherimolla* Mill.) en Michoacán, destacando a *C. fragariae* como el agente causal con una incidencia del 85 %. En el presente estudio se reporta a *C. theobromicola* como agente causal de antracnosis en

inflorescencias de guanábana, siendo un nuevo reporte fitosanitario en guanábana para México.

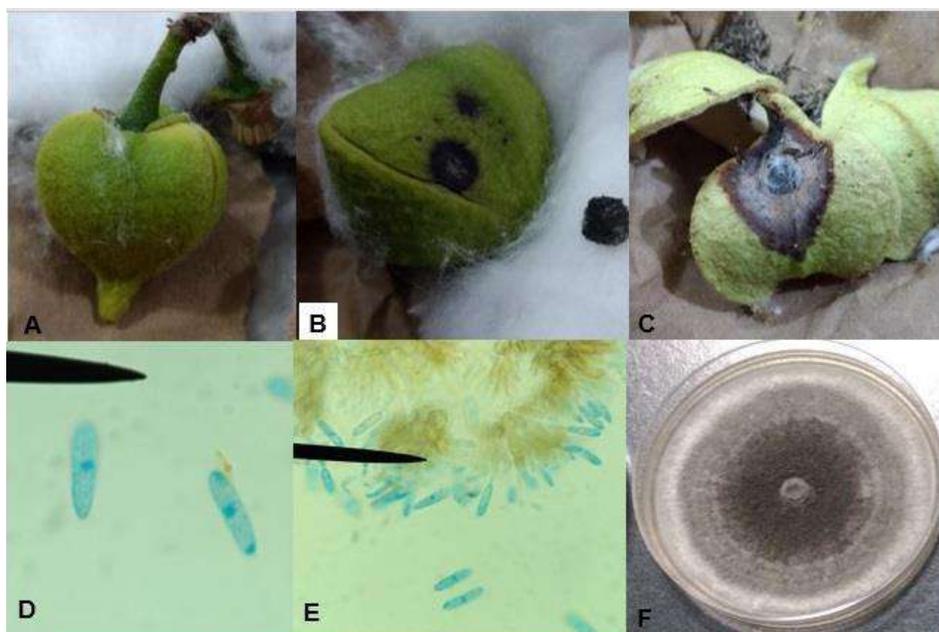


Figura 2.- (A) Testigo, inflorescencia sana. (B) Inflorescencia inoculada con *Colletotrichum* con síntomas de antracnosis. (C) Inflorescencia con acérvulos. (D-E) Conidios (100 X) y conidióforos (40 X) de *Colletotrichum* vistos al microscopio óptico. (F) *Colletotrichum theobromicola* en medio de cultivo PDA.

Antagonismo *in vitro*: Las tres cepas de *Bacillus* ejercieron un porcentaje de inhibición superior al 60 %. *Bacillus methylotrophicus* fue la cepa que ejerció el mayor PICR de *C. theobromicola* con 74.46 %, seguido por *B. amyloliquefaciens* con 72.83 % y *B. subtilis* con 62.51 % (Cuadro 3). Aunado a esto, se observaron halos de inhibición de 11.47, 11.10 y 8.30 mm para *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. methylotrophicus*, respectivamente (Figura 3). Carrillo *et al.* (2005), reportaron una inhibición *in vitro* de *C. gloeosporioides* (Penz) agente causal de antracnosis en mango de 79.3 % con *B. subtilis*, 16.8 % más de lo obtenido en nuestro estudio con una cepa de la misma especie. Guevara *et al.* (2004) obtuvieron una inhibición *in vitro* de *B. firmus* de 75 % sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* aislado de papaya maradol

roja. Este valor fue similar al PICR obtenido en nuestro estudio con *B. methylotrophicus* sobre *C. theobromicola* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Inhibición *in vitro* del crecimiento radial de *C. theobromicola* por cepas de *Bacillus* spp.

Antagonista	Patógeno	PICR*	Halo de Inhibición (mm)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>C. theobromicola</i>	72.83±0.76a	11.10±1.38ab
<i>B. methylotrophicus</i>	<i>C. theobromicola</i>	74.46±0.40a	8.30±0.2c
<i>B. subtilis</i>	<i>C. theobromicola</i>	62.51±1.79b	11.48±0.42a

*PICR=Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial

Los valores representan la media de al menos tres repeticiones ± error estándar. Los valores en la misma columna conectados por la misma literal no son diferentes estadísticamente.

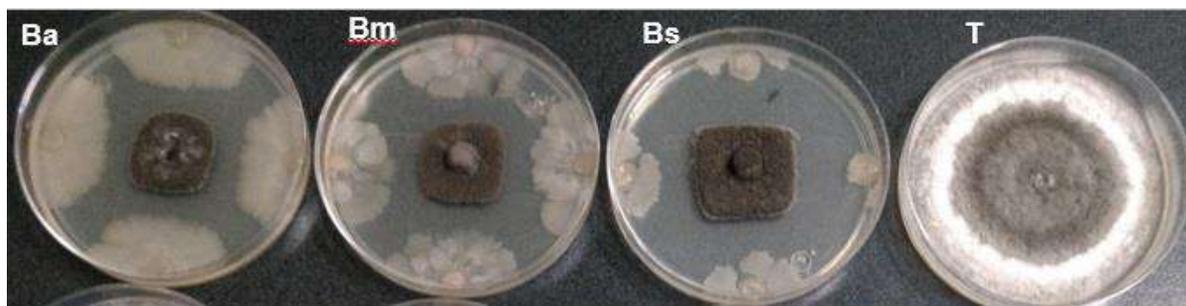


Figura 3.- Confrontaciones duales en PDA de *B. amyloliquefaciens* (Ba), *B. methylotrophicus* (Bm) y *B. subtilis* (Bs) vs *Colletotrichum theobromicola* (T).

Los mayores PICR mostrados por *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* posiblemente pueden atribuirse a la producción de antibióticos, metabolitos primarios o secundarios o enzimas degradadoras de tejidos que inhibieron el crecimiento de *C. theobromicola* (Hiradate *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2010; Qinggang Guo, 2014; Sánchez, 2016). Algunas cepas del género *Bacillus* producen lipopéptidos (surfactina, iturrinas y fengicinas) con actividad antifúngica (Yun Cao *et al.*, 2012; Qinggang Guo *et al.*, 2014; Sánchez, 2016). En un estudio realizado por Kim *et al.* (2010), la cepa *B. subtilis* CMB32 confrontada contra *C. gloeosporioides* produjo tres antifúngicos lipopéptidos:

iturina A, fengicina y surfactina A., los cuales juegan un papel importante en la inhibición del crecimiento de hongos patógenos. En el mismo sentido Hiradate *et al.* (2002) encontraron que la cepa RC-2 de *B. amyloliquefaciens* produjo siete compuestos antifúngicos (Iturinas A) secretados en el filtrado de cultivo, responsables de la inhibición del desarrollo de antracnosis *in situ* en mora (*Morus* sp.) causada por *C. dematium*.

Conclusiones

Las condiciones de alta humedad (90-100 %) en el periodo de húmedo favorecen el desarrollo y proliferación de *C. theobromicola* incrementando la incidencia de antracnosis en guanábana hasta en un 70 %, caso contrario para el periodo seco, donde se registraron los valores más bajos (0.5-18 %), debido a la quiescencia del hongo. El hongo causante de antracnosis en las inflorescencias de guanábana en Nayarit, México fue *C. theobromicola* aislado de El Tonino 2, Compostela, Nayarit, México, siendo este el primer reporte de esta especie para guanábana en México.

Las cepas de *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* mostraron mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial *in vitro*, por lo tanto, podrían ser candidatos potenciales para ser probados como agentes de control biológico de antracnosis en inflorescencias de guanábana bajo condiciones de campo abierto.

Referencias

Accuweather. México tiempo meteorológico. Consultado en línea el 31 de octubre de 2018. Disponible en <https://www.accuweather.com/es/mx/nay/nayarit-weather>

AGRIOS, G. N. 1996. Fitopatología. Noriega Editores. México, D. F, p.838.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v.15, p.403–410.

Álvarez, E.; Llano, G. A.; Mejía, J. F.; Ospina, C. A. 2002. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. Fitopatología Colombiana, Palmira, v.28, n.1, p.1-8.

Andrades, I.; Labarca, J.; Marín, Y.; Paredes, C.; Ulacio, D.; Yender, F. 2009. Evaluación de la antracnosis (*Colletotrichum* sp.) en guanábana (*Annona muricata* L.) tipo gigante en el sector Moralito del estado Zulia, Venezuela. Revista Científica UDO Agrícola, Maturín, v.9, n.1, p.148-157.

Arango, I R.; Castaño, Z. J.; Saldarriaga, C. A. 2008. Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Bogotá, v.32, n.123, p.145-156.

Barquero, Q. M; A. Peres. N.; Felipe, A. L. 2013. Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa Rica y Florida (Estados Unidos). Agronomía Costarricense, san José, v.37, n.1, p.23-38.

Barnett, H.L. y Hunter, B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 ed. Minnesota, US, p.218.

Bobadilla, M.; Zavala, F.; Sisniegas, M.; Zavaleta, G.; Mostacero, J.; Taramona, L. 2005. Evaluación larvica de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus «guanábana» sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). Revista Peruana de Biología, Lima, v.12, n.1, p.145-152.

Bogantes, A. A. y Mora, N. E. 2013. Incidencia y severidad de la antracnosis en líneas e híbridos de papaya (*Carica papaya*). *Agronomía Mesoamericana*, Alajuela, v.24, n.2, p.411-417.

Boshler, H. D. y Cordero, J. 2003. Árboles de Centroamérica un manual para extensionistas. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Oxford Forestry Institute (OFI), p.1079.

Carrillo, F. J. A.; García, E. R. S.; Muy, R. M. D.; Sañudo, B. A.; Márquez, Z. I.; Allende, M. R.; De La Garza, R. Z.; Patiño, V. M.; Galindo, F. E. 2005. Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Texcoco, v.23, n.1, p.24-32.

Cen, C. J. C. 2012. Determinación del agente causal de la pudrición del cogollo del *Agave tequilana* Weber var. Azul en el estado de Jalisco. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Tesis de Maestría en Ciencias. Montecillo, Texcoco; Edo de México, p.50.

CONABIO, 2017. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. *Annona muricata* L. Consultado en línea el 17 de noviembre de 2018. Disponible en http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/5-annon2m.pdf

French, E. R. y Hebert, T. T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (IICA). San José, Costa Rica, p.289.

Guevara, P.E.B.; Mejía, E.Z.; León, M.T.C.; Romero, I.L.; Alonso, J.G.G. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. y Sacc.] en papaya maradol roja (*Carica papaya* L.) y fisiología poscosecha de frutos infectados. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Texcoco, v.22, n.2, p.198-205.

Hernández, F. L. M.; Gómez J. R.; Andrés A. J. 2013. Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Libro Técnico Núm. 1. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit, México, p.87.

Hernández, V. L.; Castillo, R. D. G.; Chiquito, C. R. G.; López, M. H.; Ruiz B. R.; Vidal M. N. A. 2014a. La situación de las Annonaceas en México: principales plagas, enfermedades y su control. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.36, n1. p.44-54.

Hernández, V. L.; Martínez, N. A. V.; Moctezuma, H. L.; Rocha, D. G. C.; Contreras, R. G. C. 2014b. Propuesta de un plan de desarrollo integral del guanábano (*Annona muricata* L.) en el estado de Veracruz, México. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.36, n.1, p.94–101.

Hiradate, S.; Yoshida, S.; Sugie, H.; Yada, H.; Fujii, Y. 2002. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. Phytochemistry, v.61, p.693-698.

Juárez, B. G. P.; López, M. A.; Sosa, M. M. E. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. Temas selectos de ingeniería de alimentos, San Andrés Cholula, v.4, n.2, p.14-23.

Kim, P. I.; Ryu, J.; Kim, Y. H.; Chi, Y. T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. J. Microbiol. Biotechnol, v.20, n.1, p.138-145.

Martínez, B. M.; Téliz, O. D.; Mora, A. A.; Valdovinos, P. G.; Nieto, Á. D.; García, P. E.; Sánchez, L. V. 2015. Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) del fruto de litchi (*Litchi chinensis* Soon.) en Oaxaca, México. Revista Mexicana de Fitopatología, Texcoco, v.33, n.2, p.140-155.

Morales, V. y Rodríguez, M. 2006. Hongos endófitos en plantaciones de mango "Haden" de la Planicie de Maracaibo. Revista de Facultad de Agronomía (LUZ), Maracaibo, v.23, n.3, p.273-284.

Okigbo, R. N. y Obire, O. 2009. Mycoflora and production of wine from fruits of soursop (*Annona muricata* L.). International Journal of Wine Research, London, v.1, p.1-9.

Qinggong Guo; Weixin Dong; Shezeng Li; Xiuyun Lu; Peipei Wang; Xiaoyun Zhang; Ye Wang; Ping Ma. 2014. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. Microbiological Research, v.169, n.7-8, p.533-540.

Ramírez, A.; Pacheco De D. E. 2011. Composición química y compuestos bioactivos presentes en pulpas de piña, guayaba y guanábana. Interciencia, Santiago, v.36, n.1, p.71-75.

Rios, V. C.; Caro, C. J. M.; Berlanga, R. D. I.; Ruiz, C. M. F.; Ornelas, P. J. J.; Salas, M. M. A.; Villalobos, P. E.; Guerrero, P. V. M. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. Revista Mexicana de Fitopatología, Texcoco, v.34, n.1, p.84-99.

Rodríguez, L. M. y Veneros, T. R. 2011. Control biológico de *Trichoderma harzianum* RIFAI sobre hongos patógenos de frutos postcosecha de *Carica papaya* procedente de zonas de distribución del distrito Trujillo (Perú). Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas (REBIOL), v.31 n.2.

Rodríguez, L. E. S.; González, P. J. M.; Mayek, P. N. 2009. La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea*

americana Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. Revista Mexicana de Fitopatología, Texcoco, v.27, n.1, p.53-63.

Rondón C. J. C. 1999. Estudio biológico y epidemiológico de la antracnosis, del tomate de árbol y generación de alternativas para su manejo integrado en Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA. Informe Técnico. Santafé de Bogotá, D. C. p.147.

Rondón, A.; Rondón, O.; Sanabría, A. N. 2006. Respuesta *in vitro* a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de mango. Agronomía Tropical, Maracay, v.56, n.2, p.219-235.

Ruiz, C. M. F.; Ríos, V. C.; Berlanga, R. D. I.; Ornelas, P. J. J.; Acosta, M. C. H.; Romo, C. A.; Zamudio, F. P. B.; Pérez, C. D. A.; Salas, M. M. Á.; Ibarra, R. J. E.; Fernández, P. S. P. 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, México. Revista Mexicana de Fitopatología, Texcoco, v.35, n.3, p.437-462.

Ruiz, S. E. Mejía, B. M. A. Cristóbal, A. J. Valencia, B. A.; Reyes, R. A. 2014. Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, Texcoco, v.5, n.7, p.1325-1332.

Sánchez, P. F. E. 2016. Importancia de los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* en el control biológico de enfermedades en cultivos de gran valor económico. Bionatura, San Miguel de Ibarra, v.1, n.3, p.135-138.

Servicio De Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2017. Cierre de la producción agrícola por cultivo. En línea. Consultado el 8 de junio de 2018. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp.

Trinidad, Á. E.; Ascencio, V. F. De J.; Ulloa, J. A.; Ramírez, R. J. C.; Ragazzo, S. J. A.; Calderón, S. M.; Bautista, R. P. U. 2017. Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate de Nayarit, México. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas, Texcoco, Pub. Esp. n.19, p.3953-3964.

Villanueva, A. R.; Cárdenas, S. E.; Hernández, A. A. M.; Mora, A. A.; Téliz, O. D. 2006. Patogénesis de la antracnosis (*Colletotrichum fragariae*) en frutos de chirimoya. Agrociencia, Montecillo, v.40, n.8, p.773-782.

Villanueva, A. R.; Yáñez, M. M. J.; Hernández, A. A. M. 2008. Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). Agrociencia, Montecillo, v.42, n.6, p.689-701.

Weir, B. S.; Johnston, P. R.; Damm, U. 2012. *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology, Utrecht, v.73, n.1, p.115- 180.

White, T. J.; Bruns, T. Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Press, A. (Ed.), PCR protocols: A guide to methods and applications. p.315–322.

Yun Cao; Zhihui Xu; Ning Ling; Yujuan Yuan; Xingming Yang; Lihua Chen; Biao Shen; Qirong Shen. 2012. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. Scientia Horticulturae, v. 35, p.32-39.

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS Y FUNGICIDAS CONTRA *Colletotrichum theobromicola* DELACR, CAUSANTE DE ANTRACNOSIS EN INFLORESCENCIAS DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.)

IN VITRO EVALUATION OF MICROORGANISMS ANTAGONISTS AND FUNGICIDES AGAINST *Colletotrichum theobromicola* DELACR, CAUSING ANTRACNOSIS IN INFLORESCENCES OF SOURSOP (*Annona muricata* L.)

Antonio Betancourt-Aranguré¹, Octavio Jhonathan Cambero-Campos², Claudio Rios-Velasco³, Gelacio Alejo-Santiago², Elia Cruz-Crespo², Carlos Bryan Cambero-Ayón¹, Gregorio Luna-Esquivel².

¹Ing. Agrónomo. Programa de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco Nayarit, México. luzbeltz@gmail.com, camberoayon1@gmail.com.

²Dr.Sc. Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco Nayarit, México. jhony695@gmail.com, gelacioalejo@hotmail.com, ccruz2006@yahoo.com.mx, gollole@hotmail.com.

³Dr. Sc. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Unidad Cuauhtémoc, Chihuahua. Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. claudio.rios@ciad.mx.

Resumen. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el efecto antifúngico *in vitro* de seis cepas de microorganismos antagonistas sobre *Colletotrichum theobromicola* Delacr, causante de antracnosis en inflorescencias de *Annona muricata* L. en Nayarit, México. Se usaron tres cepas de *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*), tres de *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. (A7); *S. tubercidicus* (A19), y *S. viridochromogenes* (A27)) y siete fungicidas comerciales Maxtrobyn[®] (azoxistrobin SC), ExCitrus[®] (Extracto cítrico + quercetina), Canelys[®]

(Extracto de *Cinnamomum zeylanicum*), Hidrocu® PH (Hidróxido de cobre), Pull75WG® (óxido cuproso), Score® 250 EC (Difenoconazol) y Switch® 62.5 WG (cyprodinil + fludioxonil). Las dosis evaluadas de los fungicidas fueron: D1 (mitad de la dosis recomendada), D2 (dosis recomendada), y D3 (dosis recomendada más la mitad de ésta), partiendo de las dosis recomendadas por el fabricante. Los seis antagonistas mostraron un alto porcentaje de inhibición de crecimiento radial, superior a 80 %, destacando el género *Streptomyces* al inhibir hasta en un 90 % el crecimiento de *C. theobromicola*. La cepa A27 lo inhibió por completo (100 %), seguido por las cepas A19 (96.18 %) y A7 (90.4 %). Los fungicidas SCORE® 250 EC, Canelys® e Hidrocu® PH mostraron un 100 % de inhibición *in vitro* de *C. theobromicola* con las tres dosis probadas. Los resultados de este estudio demuestran el potencial de cepas de *Streptomyces* spp. y de fungicidas comerciales para el control de *C. theobromicola*, los cuales son candidatos para ser usados en el manejo integrado de antracnosis en guanábana.

Palabras clave: control químico, biológico, guanábana, fitopatógeno, *Trichoderma*, *Streptomyces*, Nayarit.

Abstract. The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* antifungal effect of six strains of antagonistic microorganisms on *Colletotrichum theobromicola* Delacr, which causes anthracnose in inflorescences of *Annona muricata* L. in Nayarit, Mexico. Were used three strains of *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. harzianum* and *T. longibrachiatum*), three strains of *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. (A7), *S. tubercidicus* (A19), and *S. viridochromogenes* (A27)) and seven commercial fungicides. Maxtrobyn® (azoxystrobin SC), ExCitrus® (Citric extract + quercetin), Canelys® (*Cinnamomum zeylanicum* extract), Hidrocu® PH (Copper hydroxide), Pull75WG® (cuprous oxide), Score® 250 EC (Difenoconazole) and Switch® 62.5 WG (cyprodinil + fludioxonil). The evaluated doses of the fungicides were: D1 (half of the recommended dose), D2 (recommended dose), and D3 (recommended dose plus half of it), starting from the doses recommended by the manufacturer. The six antagonists showed a high percentage of inhibition of radial growth, higher than 80%, highlighting

the genus *Streptomyces* by inhibiting up to 90% the growth of *C. theobromicola*. Strain A27 completely inhibited it (100%), followed by strains A19 (96.18%) and A7 (90.4%). SCORE® 250 EC, Canelys® and Hidrocu® PH fungicides showed 100% *in vitro* inhibition of *C. theobromicola* with the three doses tested. The results of this study demonstrate the potential of strains of *Streptomyces* spp. and of commercial fungicides for the control of *C. theobromicola*, which are candidates to be used in the integrated management of anthracnose in soursop.

Keywords: chemical control, biological, soursop, phytopathogen, *Trichoderma*, *Streptomyces*, Nayarit.

Introducción

En guanábana (*A. muricata* L.), la antracnosis, se atribuye principalmente al género *Colletotrichum*, y es considerada la enfermedad de mayor importancia económica, ya que provoca necrosamiento y pérdida de inflorescencias y frutos durante todo el año; la mayor agresividad es durante los periodos de precipitación con humedad relativa superior al 90 %, además ataca hojas, brotes y ramas jóvenes (Rondón, 1999; Villanueva *et al.*, 2006; Andrades *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2014a). Los pétalos de las inflorescencias afectadas muestran pequeñas lesiones de color café a negro, las cuales se agrandan y hunden, causando la caída prematura de pétalos e inclusive la pérdida total de la estructura floral (Álvarez *et al.*, 2002; Hernández, 2013; Hernández *et al.*, 2014b). En Colombia se han registrado pérdidas superiores al 90 % en huertos no tecnificados (Álvarez *et al.*, 2002). En Veracruz, México, Hernández *et al.* (2014b) registraron una incidencia del 75.92 % de antracnosis en guanábana causada por *Colletotrichum*.

En México, el estado de Nayarit es el principal productor de guanábana, responsable del 75.6 % correspondiente a una producción de 21,810.86 t (SIAP, 2017). La antracnosis causada por *C. gloeosporioides* puede disminuir hasta en 90 % el rendimiento de guanábana (Pinto *et al.*, 2005). Por lo que, los daños causados por este

hongo fitopatógeno reafirman la necesidad de desarrollar y evaluar nuevos fungicidas más eficientes y amigables con el ambiente (Juárez *et al.*, 2010). Debido a que el uso de fungicidas químicos de amplio espectro está siendo regulado y restringido por sus efectos adversos al ambiente y a la salud humana, además de inducir el desarrollo de resistencia en los organismos blanco (Astúa *et al.*, 1994).

Entre las alternativas que han mostrado potencial en el control de enfermedades se encuentra el uso microorganismos antagonistas como agentes de control biológico (Carrillo *et al.*, 2005), en especial cepas de los géneros *Bacillus*, *Trichoderma* y *Streptomyces* que han mostrado potencial antimicrobiano al ser evaluados contra fitopatógenos como *Moniliophthora*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium* y *Bacillus* (Chavarría *et al.*, 2005; Rodríguez y Veneros 2011; Rincón *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2015; Rios-Velasco *et al.*, 2016; Tenorio y Mollinedo, 2016; Evangelista *et al.*, 2017).

Otra alternativa para el manejo de antracnosis en guanábana podría ser el uso formulaciones a base de moléculas sintéticas y extractos vegetales. En frutales y hortalizas como mango (*Mangifera indica* L.), papaya (*Carica papaya* L.), mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) y chile (*Capsicum annuum* L.) se han probado algunas de estas formulaciones con resultados satisfactorios en el control de antracnosis, especialmente con la aplicación de difenoconazol, hidróxido de cobre, mancozeb, azoxistrobina, prochloraz y extracto de lavanda (Zabala *et al.*, 2005; Arias y Carrizales, 2007; Santamaría *et al.*, 2011; Gaviria *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2015; Linu y Jisha, 2017; Villacís *et al.*, 2017).

Con base en lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto antifúngico de seis microorganismos antagonistas y siete fungicidas comerciales sobre el crecimiento *in vitro* de *C. theobromicola*, causante de antracnosis en inflorescencias de guanábana en Nayarit, México.

Materiales y métodos

Antagonismo *in vitro*: Se evaluó el antagonismo *in vitro* de *T. asperellum* (Ta), *T. harzianum* (Th), *T. longibrachiatum* (Tl), y las actino-bacterias *Streptomyces* sp. (A7), *S. tubercidicus* (A19) y *S. viridochromogenes* (A27) contra *C. theobromicola*. La identificación y patogenicidad de este hongo en inflorescencias se confirmó con estudios previos. La cepa fue depositada en el cepario del Laboratorio de Parasitología Agrícola (Cemic 03) de la Universidad Autónoma de Nayarit. Los antagonistas fueron proporcionados por el cepario del Laboratorio de Patología Vegetal y Control Biológico del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Sede Chihuahua-Campus Cuauhtémoc.

Las confrontaciones se realizaron en cajas de Petri (90 × 15 mm) que contenían el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA, DIBICO®). El efecto antifúngico de los antagonistas vs *C. theobromicola* se determinó por el método de confrontación de cultivos. Las cepas de *Streptomyces* spp., se crecieron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar PDA por 10 d, para lo cual se colocaron discos de cultivo de 7 mm de diámetro en los cuatro puntos cardinales de las cajas de Petri que contenían PDA, después de esta incubación se sembraron en el centro de las cajas, discos de cultivo de 7 mm del hongo *C. theobromicola* de 7 d de edad (micelio y conidios sin cuantificar).

Las cepas de *Trichoderma* se confrontaron mediante cultivos duales, para lo cual el antagonista se colocó en un extremo de la caja y el patógeno en el extremo opuesto de la caja de Petri, ambos fueron sembrados el mismo día. Ambos experimentos se realizaron por triplicado donde cada repetición constó de tres cajas de Petri, y como testigo positivo se utilizaron nueve cajas de Petri con PDA sembradas con *C. theobromicola* en ausencia de los antagonistas (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017).

Las cajas se incubaron a 28 °C en una incubadora Novatech® (modelo EI60-AIA) en ausencia de luz y el crecimiento radial de los microorganismos confrontados se midió sistemáticamente cada 24 h por 3 y 4 d para las cepas de *Trichoderma* spp.

y 12 d para las cepas de *Streptomyces* spp. El antagonismo *in vitro* se evaluó mediante la estimación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno (PICR), usando la fórmula $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$, donde R1 fue el crecimiento radial del patógeno testigo y R2 el crecimiento radial del patógeno en la confrontación.

El tipo de antagonismo de *Trichoderma* se determinó mediante la escala de Bell *et al.* (1982), la cual consta de cinco tipos: 1.- El antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno; 2.- El antagonista sobrepasa las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo; 3.- El antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno domina al otro; 4.- El patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja; 5.- El agente fitopatológico cubre totalmente la caja.

Mientras que el tipo de antagonismo por parte de las cepas de *Streptomyces* se determinó de acuerdo con la escala propuesta por Pérez-Corral *et al.* (2015), donde propone seis tipos. 1) crecimiento nulo del hongo (0 %); 2) crecimiento radial (1 % a 25 %); 3) crecimiento radial (26 % a 50 %); 4) crecimiento radial mayor a 50 %; sin sobrecrecer al actinomiceto; 5) presencia de halo; y 6) sobre-crecimiento al 100 % del actinomiceto por parte del hongo (sin antagonismo).

Evaluación *in vitro* de fungicidas: Se evaluó la sensibilidad de *C. theobromicola* a siete fungicidas comerciales: Maxtrobyn® (azoxistrobin SC), ExCitrus® (Extracto cítrico + quercetina), Canelys® (Extracto de *Cinnamomum zeylanicum*), Hidrocu® PH (Hidróxido de cobre), Pull75WG® (óxido cuproso), SCORE® 250 EC (Difenoconazol) y SWITCH® (cyprodinil + fludioxonil) 62.5 WG (Cuadro 1). Las dosis evaluadas, fueron consideradas en función a las dosis recomendadas por el fabricante, mitad de la dosis recomendada (dosis baja (D1)), dosis recomendada (dosis media (D2)) y dosis recomendada más la mitad de ésta (dosis alta (D3)).

El experimento consistió de cinco repeticiones donde cada repetición constó de una caja de Petri para cada dosis con cinco testigos para cada tratamiento. Se mezcló cada dosis del fungicida con el PDA a 48 °C y se agitó para homogeneizar la mezcla antes de ser vertida en las cajas de Petri (90 x 15 mm). Posteriormente, se colocaron discos (explantes de 0.7 mm) del cultivo de *C. theobromicola* de 7 d de edad, en el centro de las cajas de Petri. Los testigos consistieron de la siembra del hongo *C. theobromicola* en PDA en ausencia de los fungicidas. El crecimiento radial del hongo se midió cada 24 h por 12 d, tiempo en el cual los testigos llenaron por completo las cajas de Petri (Gaviria *et al.*, 2013). Con base en estas mediciones se calculó el PICR de *C. theobromicola* con la formula arriba mencionada.

Cuadro 1.- Fungicidas y dosis evaluadas *in vitro* contra *C. theobromicola*.

Tratamiento	Fungicida		Dosis (mL o g/L ⁻¹)		
	Nombre comercial	Ingrediente activo	D1	D2	D3
T1	Maxtrobyn [®]	Azoxistrobin SC	0.44 mL	0.88 mL	1.32 mL
T2	ExCitrus [®]	Extracto cítrico + quercetina	2.5 mL	5 mL	7.5 mL
T3	Canelys [®]	Extracto de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	2.5 mL	5 g mL	7.5 mL
T4	Hidrocu [®] PH	Hidróxido de cobre	2.5 g	5 g	7.5 g
T5	Pull75WG [®]	Óxido cuproso	2.5 g	5 g	7.5 g
T6	SCORE [®] 250 EC	Difenoconazol	1.5g	3 g	4.5 g
T7	SWITCH [®]	Cyprodinil + fludioxonil	3 g	6 g	9 g

Las dosis evaluadas están en función a la dosis recomendada por el fabricante, (D1) dosis baja que consistió en la mitad de la dosis recomendada; (D2) dosis media que consistió de la dosis recomendada y (D3) dosis alta que consistió de la dosis recomendada más la mitad de esta.

Diseño experimental y análisis estadístico: Se utilizó un diseño completamente al azar. A los datos del PICR se les aplicó un análisis de varianza y

una prueba de separación de medias por Tukey ($\alpha = 0.05$) mediante el programa Statistical Analysis System (Sas Institute Inc., 2009).

Resultados y discusión

Antagonismo *in vitro*: Los seis antagonistas de ambos géneros (*Streptomyces* y *Trichoderma*) mostraron altos PICR sobre *C. theobromicola* (Figura 1), destacando las cepas de *Streptomyces*, que inhibieron el crecimiento del patógeno (>90 y hasta el 100 %). La cepa A27 lo inhibió por completo (100 %), seguida por las cepas A19 y A7 con 96.18 y 90.4 %, respectivamente. Las tres cepas mostraron halos de inhibición de 26.35, 26.03 y 24.2 mm por parte de las cepas A27, A19 y A7, respectivamente.

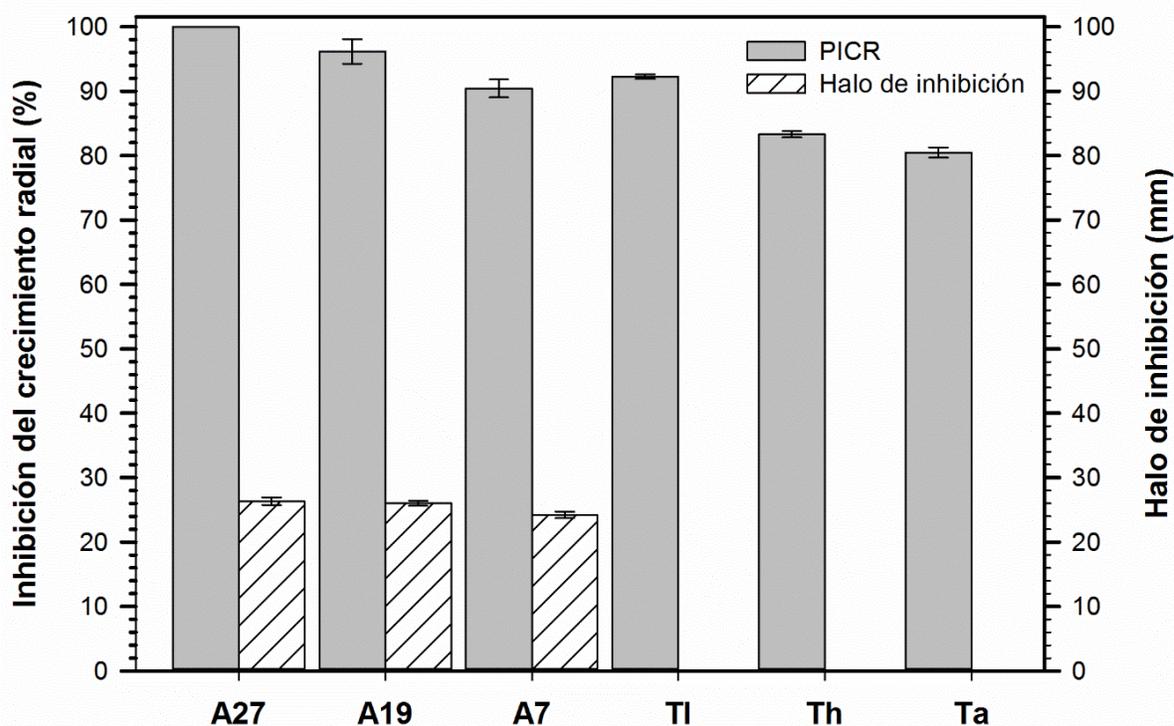


Figura 1.- PICR y halo de inhibición de antagonistas vs *C. theobromicola*. *Streptomyces* sp. (A7), *Streptomyces tubercidicus* (A19), *Streptomyces viridochromogenes* (A27), *Trichoderma asperellum* (Ta), *Trichoderma harzianum* (Th) y *Trichoderma longibrachiatum* (TI).

El antagonismo fue del tipo 1 para A27 donde el crecimiento del hongo fue nulo (0 %) y tipo 2 para A7 y A19 donde el crecimiento radial fue de 1 a 25 %. Nuestros resultados difieren con los obtenidos por Dávila *et al.* (2013), ya que al evaluar *in vitro* aislados de *Streptomyces* sp. contra hongos fitopatógenos como *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Colletotrichum* sp., reportaron inhibiciones menores al 62 %, donde la mayor inhibición la registraron contra *Colletotrichum* sp.

La capacidad antifúngica de nuestras cepas evaluadas pudo deberse a la producción de algún antibiótico por parte de las cepas de *Streptomyces* (De Lima *et al.*, 2012; Atta, 2015; Pathalam *et al.*, 2017). Al respecto Srividya *et al.* (2012) mencionan que uno de los mecanismos de biocontrol de *Streptomyces* es mediante la producción de enzimas micolíticas principalmente quitinasa y β -1, 3 glucanasa así como celulasa, lipasa y proteasa. En un estudio realizado por Savarana *et al.* (2014) encontraron que el principio activo de la cepa SCA 7 de *Streptomyces* sp. fue el compuesto 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol. En el mismo sentido Shaik *et al.* (2017) encontraron tres aislados de *Streptomyces* con actividad antifúngica los cuales producían los metabolitos bioactivos alpha amilasa, lipasa, proteasa y celulasa. Atta (2015) encontró que *S. torulosus* produce tunicamicina, un antibiótico de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y de hongos unicelulares y filamentosos.

Las tres cepas de *Trichoderma* también mostraron potencial antifúngico *in vitro* al inhibir a *C. theobromicola* hasta en un 92.27 %, siendo *T. longibrachiatum* la cepa más efectiva, seguida de las cepas *T. harzianum* y *T. asperellum* con inhibiciones del 83.33 y 80.48 %, respectivamente. Las tres cepas de *Trichoderma* mostraron antagonismo tipos; 1 para *T. asperellum* y *T. harzianum* (es decir el antagonista ocupó completamente la superficie de la caja cubriendo totalmente al patógeno) y 2 para *T. longibrachiatum* (donde el antagonista sobrepasó las dos terceras partes de la superficie de la caja). *Trichoderma* se ha propuesto como un agente potencial de control biológico de *Colletotrichum* spp., debido a su rápido crecimiento y a la actividad de sus enzimas líticas como quitinasas, endoglucanasas y exoglucanasas (Hoyos *et*

al., 2008; Rodríguez y Veneros 2011; Sanmartín *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 2012). Peláez *et al.* (2016) reportaron un 91 % de inhibición *in vitro* del crecimiento de *C. gloeosporioides* por *T. asperellum*, ellos también observaron un sobrecrecimiento en el fitopatógeno. Además, los mismos autores encontraron un efecto sinérgico en el uso integrado de *T. asperellum* y una dosis baja del fungicida captan 50® (0.1 g L⁻¹) lo que condujo a la inhibición del crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides* en un 99 %.

El potencial antifúngico (inhibición *in vitro* >80 %) de nuestros aislados de *Trichoderma*, superan hasta cuatro veces los valores reportados por De la Cruz *et al.* (2018), quienes encontraron inhibiciones *in vitro* de 9.5, 22.5 y 21.9 % por cepas de *T. harzianum*, *T. asperellum* y *T. longibrachiatum*, respectivamente. Ghosh y Chakraborty (2012) demostraron el potencial *in vitro* de cepas de *T. viride* como agente de control biológico de *C. gloeosporioides*, ellos encontraron que las esporas de *Trichoderma* se adhieren a las paredes de *C. gloeosporioides* y las contraen. Al respecto, Vargas *et al.* (2012) al evaluar la actividad antagónica *in vitro* de cepas de *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* y *T. harzianum* contra *Colletotrichum* sp., encontraron que el 33.33 % de sus cepas mostraron un porcentaje de inhibición superior al 70 %, destacando las cepas de *T. asperellum*.

Mientras que Sanmartín *et al.* (2012) encontraron cepas de *T. asperellum* con inhibiciones *in vitro* contra *C. gloeosporioides* superiores al 55.5 pero menores al 66.8 %, esta actividad antagónica fue correlacionado con la producción de enzimas quitinolíticas y celulolíticas. En un estudio realizado por Rodríguez y Veneros (2011), encontraron que las hifas de *T. harzianum* cubrieron y degradaron (micoparasitismo) las hifas de los patógenos (*R. nigricans*, *C. gloeosporioides*, *A. alternata*, *S. lycopersici*, *F. oxysporum*, *L. thebromae*).

Evaluación *in vitro* de fungicidas: La susceptibilidad de *C. theobromicola* a los siete fungicidas evaluados fue variable, ya que Canelys®, Hidrocu® PH y SCORE® 250 EC inhibieron el 100 % del crecimiento del hongo con sus tres dosis; Pull75WG® inhibió el 100 % con la D2 y D3; Switch® 62.5 WG mostró resultados de 93.1 a 98.67

%; Excitri® mostró inhibiciones de 47, 77 y 98 % con las dosis D1, D2 y D3, respectivamente; Maxtrobyn® mostró los valores de inhibición más bajos (68.44, 71.60 y 65.05 %) contra *C. theobromicola* con las dosis D1, D2 y D3, respectivamente (Figura 2). Los fungicidas Canelys® e Hidrocu® PH, demostraron un alto potencial *in vitro* contra *C. theobromicola* por lo que podrían ser una alternativa viable para el control de antracnosis en condiciones de campo, debido a que son considerados como amigables con el ambiente, además de ser de bajo costo.

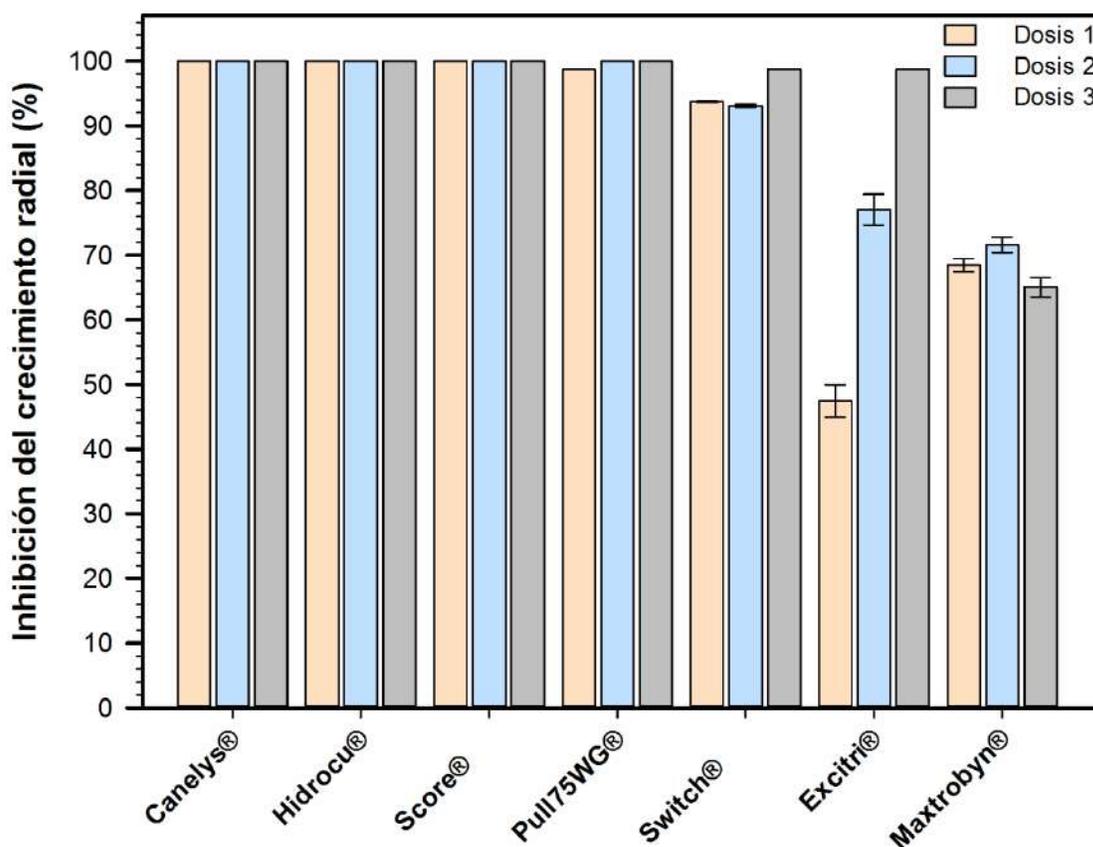


Figura 2.- Inhibición *in vitro* del crecimiento radial de *C. theobromicola* por fungicidas comerciales. **Las dosis evaluadas están en función a la dosis recomendada por el fabricante, (D1) dosis baja que consistió en la mitad de la dosis recomendada; (D2) dosis media que consistió de la dosis recomendada y (D3) dosis alta que consistió de la dosis recomendada más la mitad de esta.**

Gaviria *et al.* (2013) obtuvieron resultados similares con Score 250® EC (difenoconazol 100 ppm) y Kocide® 101 (hidróxido de cobre 2460 ppm) con el 100 %

de inhibición *in vitro* de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. Mientras que los valores obtenidos con Amistar® 50 WG (azoxystrobin 63 ppm) no fueron diferentes ya que fluctuó de 38.75 a 70 %. Al respecto, Linu y Jisha (2017) evaluaron tres fungicidas (carbendazim, 0.05 %, mancozeb, 0.2 % y azoxystrobin, 0.1 %) *in vitro* contra *C. capsici* y obtuvieron porcentajes de inhibición de 64.12, 73.47 y 62.21 %, respectivamente, donde la inhibición de azoxystrobin fue similar al obtenido en nuestra investigación. Zavala *et al.* (2005) al evaluar el efecto *in vitro* de azoxystrobin contra *C. gloeosporioides* reportaron una inhibición menor (59.8 %) al encontrado en nuestro estudio, mientras que al evaluarlo *in vivo* en el control de *C. gloeosporioides* solo redujo la severidad de antracnosis en papaya en un 20.35 %.

Por otra parte, en estudios *in vivo* de algunos de estos fungicidas como azoxistrobina en mezcla con ciproconazole a una dosis de 50 g/100 L⁻¹ se ha reducido la incidencia (por debajo del 25 %) de antracnosis en frutos de mango poscosecha causada por *C. gloeosporioides* (Arias y Carrizales, 2007). En otro estudio realizado por Pérez *et al.* (2015) reportaron un 100 % de protección de las hojas *Sansevieria trifasciata var. Hahnii* de la antracnosis causada por *C. sansevieriae*, al aplicar azoxistrobin. Mientras que en frutos de papaya maradol, azoxystrobin mostró un 87.5 % de efectividad en la reducción de la severidad de *C. gloeosporioides* (Santamaría *et al.*, 2017).

Conclusiones

Ambos grupos de antagonistas mostraron potencial de biocontrol *in vitro* por lo que podrían ser candidatos potenciales para ser evaluados en el control de antracnosis en inflorescencias de guanábana en campo. La cepa A27 de *Streptomyces* inhibió por completo el crecimiento *in vitro* de *C. theobromicola*. Las cepas de *Trichoderma* inhibieron a *C. theobromicola* en valores superiores al 80.48 %.

Los fungicidas Canelys®, Hidrocu® PH y SCORE® 250 EC fueron los más eficaces al inhibir por completo (100 %) el crecimiento *in vitro* de *C. theobromicola*. ExCitri® y Maxtrobyn® fueron los menos efectivos, sin embargo, mostraron porcentajes

de inhibición superiores al 47.43. Con base en estos resultados, los fungicidas Canelys[®], Hidrocu[®] PH, SCORE[®] 250 EC, Pull75WG[®] y Switch[®] 62.5 WG podrían ser una alternativa potencial para el control químico de antracnosis en campo como parte de un esquema de manejo integrado.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos con No. de Proyecto (266891).

Referencias bibliográficas

- Álvarez, E., Llano, G. A., Mejía, J. F. y Ospina, C. A. (2002). Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. Fitopatología Colombiana, 28 (1): 1-8. Disponible en: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/Caract_colletotrichum%20EAlvarez1%20_2.pdf.
- Andrades, I., Labarca, J., Marín, Y., Paredes, C., Ulacio, D. y Yender, F. (2009). Evaluación de la antracnosis (*Colletotrichum* sp.) en guanábana (*Annona muricata* L.) tipo gigante en el sector Moralito del estado Zulia, Venezuela. Revista Científica UDO Agrícola, 9 (1): 148-157. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3293882>.
- Arias, R. B. y Carrizales, L. (2007). Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y postcosecha en el municipio Cedeño, estado de Monagas, Venezuela. Bioagro, 19 (1): 19-25. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85719103>.
- Astúa, G., Arauz, L. F. y Umaña, G. (1994). Sensibilidad reducida al tiabendazole en *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de papaya. Agronomía Costarricense, 18: 35-39. Disponible en: http://www.mag.go.cr/rev_agr/v18n01_035.pdf.

- Atta H. M. (2015). Biochemical studies on antibiotic production from *Streptomyces* sp.: Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19: 12-22. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610311002596>.
- Bell, D. K., Wells, H. D. y Markham, C. R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 378-382. Disponible en: <https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Pages/default.aspx>.
- Carrillo, F. J. A., García, E. R. S., Muy, R. M. D., Sañudo, B. A., Márquez, Z. I., Allende, M. R., De La Garza, R. Z., Patiño, V. M. y Galindo, F. E. (2005). Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23 (1): 24-32. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61223104>.
- Chavarría, M., Uribe, L. y Bolaños A. (2005). Microorganismos benéficos en el control de enfermedades en jengibre. *Agronomía Costarricense*, 29 (3): 145-155. Disponible en: http://www.mag.go.cr/rev_agr/v29n03_145.pdf.
- Dávila M. M. D., Gallegos, M. G., Hernández, C. F. D., Ochoa, F. Y. M. y Flores O. A. (2013). Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4 (8): 1187-1196. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342013000800006.
- De la Cruz, Q. R., Roussos, S., Rodríguez, H. R., Hernández, C. D. y Aguilar, C. N. (2018). Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala International Journal of Modern Science*, 4 (2): 237-243. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405609X17306115>.
- De Lima, P. R. E., Reis da S. I., Kassawara, M. M., Lúcio de A. J. y Magali de A. J. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of*

- Infectious Diseases, 16 (5): 466-471. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867012001341>.
- Evangelista, M. Z., Quiñones, A. E. E. y Rincón, E. G. (2017). Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. Temas de Ciencia y Tecnología, 21 (63): 39-51. Disponible en: http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas63/T63_E011-2017.pdf.
- Gaviria, H. V., Patiño, H. L. F. y Saldarriaga, C. A. (2013). Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla. Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 14 (1): 67-75. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0122-87062013000100008.
- Ghosh, S. y Chakraborty, N. (2012). *In vitro* biological control of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal organism of anthracnose of sarpagandha (*Rouloffia serpentina*). Agriculture and Biology Journal of North America, 3: 306-310. DOI:10.5251/abjna.2012.3.8.306.310.
- Hernández, F. L. M., Gómez J. R. y Andrés A. J. (2013). Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Libro Técnico Núm. 1. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit, México, p.87.
- Hernández, V. L., Castillo, R. D. G., Chiquito, C. R. G., López, M. H., Ruiz B. R. y Vidal M. N. A. (2014a). La situación de las Annonaceae en México: principales plagas, enfermedades y su control. Revista Brasileira de Fruticultura, 36 (1): 44-54. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452014000500005.
- Hernández, V. L., Martínez, N. A. V., Moctezuma, H. L., Rocha, D. G. C. y Contreras, R. G. C. (2014b). Propuesta de un plan de desarrollo integral del guanábano (*Annona muricata* L.) en el estado de Veracruz, México. Revista Brasileira de Fruticultura, 36 (1): 94-101. Disponible en:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452014000500011.

- Hoyos, C. L., Duque, G. y Orduz, S. (2008). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 2 (1): 76-86. Disponible en: https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_horticolos/article/view/1175.
- Juárez, B. G. P., López, M. A. y Sosa, M. M. E. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. Temas selectos de ingeniería de alimentos, 4 (2): 14-23. Disponible en: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TsIA-4\(2\)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TsIA-4(2)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf).
- Linu, M. S. y Jisha, M. S. (2017). *In vitro* control of *Colletotrichum capsici* induced chilli anthracnose by fungicides and biocontrol agent. International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture (IJAPSA), 3 (5): 27-33. Disponible en: <https://ijapsa.com/published-papers/volume-3/issue-5/in-vitro-control-of-colletotrichum-capsici-induced-chilli-anthracnose-by-fungicides-and-biocontrol-agent.pdf>.
- Pathalam, G., Appadurai, D. R., Rajendran, H. A. D., Munusamy, R. G., Michael Gabriel Paulraj, Naif Abdullah Al-Dhabi, y Savarimuthu, I. (2017). Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India. Alexandria Journal of Medicine, 53: 101-110. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090506816300094>.
- Peláez, A. A., de los Santos, V. S., Yépez, E. A., Parra, C. F. I. y Reyes, R. R. T. (2016). Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y Captan 50[®] contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 7 (6): 1401-1412. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000601401.
- Pérez, C. D. A., García, G. N. Y. Gallegos, M. G. Ruiz, C. M. F. Berlanga, R. D. I. y Ríos, V. C. (2015). Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagónicos a *Fusarium equiseti*. Revista Mexicana de

Ciencias Agrícolas. 6 (7): 1629-1638. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342015000700016&script=sci_abstract.

Pérez, L. G., Castillo, M. R., Chavarría, P. L., Brenes, A. A. y Gómez, A. L. (2015). Combate químico de la antracnosis de *Sansevieria trifasciata* var. Hahnii en un sistema de hojas separadas. *Agronomía Mesoamericana*, 26 (2): 305-313. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212015000200305&script=sci_abstract&tlng=es.

Pinto, A. C., Cordeiro, R. M. C., De Andrade, M. S. R., Ferreira, H. F., De Filgueiras, A. H., Alves, E. R. and Kinpara, I. D. (2005). *Annona* species. International Centre for Underutilised Crops (ICUC). University of Southampton, UK 268 p.

Rincón, E. G., López, P. L. y Quiñones, A. E. E. (2014). Efectividad biológica *in vitro* de actinomicetos sobre el agente causal del tizón de halo en frijol. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37 (3): 229-234. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802014000300008.

Rios, V. C., Caro, C. J. N., Berlanga, R. D. I., Ruíz, C. M. F., Ornelas, P. J. J., Salas, M. M. A., Villalobos, P. E. y Guerrero, P. V. M. (2016). Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34 (1): 84-99. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092016000100085&script=sci_abstract.

Rodríguez, L. M. y Veneros, T. R. (2011). Control biológico de *Trichoderma harzianum* RIFAI sobre hongos patógenos de frutos postcosecha de *Carica papaya* procedente de zonas de distribución del distrito Trujillo (Perú). *Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas (REBIOL)*, 31 (2): 1-9. Disponible en: http://www.facbio.unitru.edu.pe/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=102&Itemid=62.

Rondón C. J. C. (1999). Estudio biológico y epidemiológico de la antracnosis, del tomate de árbol y generación de alternativas para su manejo integrado en

- Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA. Informe Técnico. Santafé de Bogotá, D. C. p.147.
- Ruiz, C. M. F., Rios, V. C., Berlanga, R. D. I., Ornelas, P. J. J., Acosta, M. C. H., Romo, C. A., Zamudio, F. P. B., Pérez, C. D. A., Salas, M. M. Á., Ibarra, R. J. E. y Fernández, P. S. P. (2017). Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35 (3): 437-462. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1704-3.
- Sanmartín, N. P., López, X., Pemberthy, M. P., Granada, S. D. y Rueda, L. E. A. (2012). Análisis del modo de acción y de la capacidad antagonista de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *Revista Tumbaga*, 2 (7): 29-49. Disponible en: <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/viewFile/36/353>.
- Santamaría, B. F., Díaz, P. R., Gutiérrez, A. O., Santamaría, F. J. y Larqué, S. A. (2011). Control de dos especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de papaya maradol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2 (5): 631-643. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342011000500001.
- Saravana K. P., Duraipandiyar, V. y Ignacimuthu, S. (2014). Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 30: 435-446. DOI: 10.1016/j.kjms.2014.05.006.
- Servicio De Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2017). Cierre de la producción agrícola por cultivo. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp. [Última consulta: 14 de noviembre de 2018].
- Shaik, M., Girija, S. G., Iswarya, M. y Rajitha, P. (2017). Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15: 87-94. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X17300124>.

- Srividya, S., Adarshana, T., Deepika, V. B., Kajingailu, G. y Nilanjan, D. (2012). *Streptomyces* sp. 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens. *European Journal of Experimental Biology*, 2 (1): 163-173. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/a033/0930990a4fe62c928bf7db9f9fc37067786f.pdf>.
- Tenorio, R. y Mollinedo, P. A. (2016). Inhibitory capacity of filtrates from *Trichoderma inhamatum* and *Caiophora andina* over phytopathogens of *Theobroma cacao*. *Revista Boliviana de Química*, 33 (3): 116-126. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602016000300002.
- Vargas, H. H. A., Rueda, L. E. A. y Gilchrist, R. E. (2012). Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* (Fungi: Ascomycota) a diferentes temperaturas. *Actualidades Biológicas*, 34 (96): 103-112. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/acbi/v34n96/v34n96a08.pdf>.
- Villacís, A. L. A., León, G. O., Santana, M. R., Mangui, T. J., Carranza, G. y Pazmiño, M. P. (2017). Actividad anti fúngica (*in vitro*) de extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum acutatum*). *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5 (1): 59-64. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592017000100007.
- Villanueva, A. R., Cárdenas, S. E., Hernández, A. A. M., Mora, A. A. y Téliz, O. D. (2006). Patogénesis de la antracnosis (*Colletotrichum fragariae*) en frutos de chirimoya. *Agrociencia*, 40 (8): 773-782. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2100819>.
- Zavala, L. M. J., Tun, S. J. M., Cristóbal, A. J., Ruiz, S. E., Gutiérrez, A. O., Vázquez, C. M. y Méndez-G. R. (2005). Control postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 11 (2): 251-255. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v2n5/v2n5a1.pdf>.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES

Las condiciones de alta humedad (90-100 %) en el periodo de húmedo favorecen el desarrollo y proliferación de *C. theobromicola* incrementando la incidencia de antracnosis en guanábana hasta en un 70 %, caso contrario para el periodo seco, donde se registraron los valores más bajos, debido a la quiescencia del hongo. El hongo causante de antracnosis en las inflorescencias de guanábana en Nayarit, México fue *C. theobromicola* aislado de la huerta “El Tonino 2” de Compostela, Nayarit, México, siendo este el primer registro de esta especie para guanábana en México.

Los tres grupos de antagonistas mostraron potencial de biocontrol *in vitro* por lo que podrían ser candidatos potenciales para ser evaluados en el control de antracnosis en inflorescencias de guanábana en campo. La cepa A27 de *Streptomyces* inhibió por completo el crecimiento *in vitro* de *C. theobromicola*. Las cepas de *Trichoderma* inhibieron a *C. theobromicola* en valores superiores al 80 %. Mientras que las cepas de *Bacillus* mostraron porcentajes de inhibición de *C. theobromicola* variables de 62.51 a 74.46 %.

Los fungicidas Canelys[®], Hidrocu[®] PH y SCORE[®] 250 EC fueron los más eficaces al inhibir por completo (100 %) el crecimiento *in vitro* de *C. theobromicola*. ExCitri[®] y Maxtrobyn[®] fueron los menos efectivos, sin embargo, mostraron porcentajes de inhibición superiores al 47.43. Con base en estos resultados, los fungicidas Canelys[®], Hidrocu[®] PH, SCORE[®] 250 EC, Pull75WG[®] y Switch[®] 62.5 WG podrían ser una alternativa potencial para el control químico de antracnosis en campo como parte de un esquema de manejo integrado.

CAPÍTULO VI

LITERATURA CITADA

- Álvarez, E., Llano, G. A., Mejía, J. F. y Ospina, C. A. 2002. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el valle el cauca. *Fitopatología colombiana*, 28 (1): 1-8.
- Andrades, I., Labarca, J., Marín, Y., Paredes, C., Ulacio, D. y Yender, F. 2009. Evaluación de la antracnosis (*Colletotrichum* sp.) en guanábana (*Annona muricata* L.) tipo gigante en el sector Moralito del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9 (1): 148-157.
- Andrés, A. J. y Andrés, H. L. 2011. *Biología, diversidad, conservación y uso sostenible de los recursos genéticos de annonaceae en México*. Chapingo: Centro Regional Universitario Centro Occidente, Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de México. 146 pp.
- Arango, I R., Castaño, Z. J. y Saldarriaga, C. A. 2008. Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 32 (123): 145-156.
- Argumedo, D. R., Alarcón, A., Ferrera, C. R. y Peña, C. J. J. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25 (4): 257-269.
- Arias, R. B. y Carrizales, L. 2007. Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y postcosecha en el municipio Cedeño, estado de Monagas, Venezuela. *Bioagro*, 19 (1): 19-25.
- Atta H. M. 2015. Biochemical studies on antibiotic production from *Streptomyces* sp.: Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19: 12-22.
- Avila, M., Herrera, E. M., Peña, A. y Cabriales, J. 2006. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma*

- harzianum* and their capacity to control *Allium* white-rot under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 38 (7): 1823-1830.
- Barquero, Q. M., Peres N. A. y Felipe A. L. 2013. Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa Rica y Florida (Estados Unidos). *Agronomía Costarricense*, 37 (1): 23-38.
- Becerra, L. E. N. y Rosas, G. X. 2015. Manejo integral de plagas y enfermedades del guanábano. In: Anonáceas. Plantas antiguas. Estudios recientes. Parte 2. Vidal-Lezama, E. Vidal M. N. A. Vidal H. L. (Comp.) Universidad Autónoma Chapingo. Versión electrónica. Chapingo, Texcoco, Edo. de México. p. 177.
- Becerra, L. E. N., Vidal H. L. y Rosas, G. X. 2015. Importancia del injerto en guanábano (*Annona muricata* L.). In: Anonáceas. Plantas antiguas. Estudios recientes. Parte 2. Vidal-Lezama, E. Vidal M. N. A. Vidal H. L. (Comp.) Universidad Autónoma Chapingo. Versión electrónica. Chapingo, Texcoco, Edo. de México. p. 163.
- Benavides, G. A. 2004. Caracterización numérica de germoplasma de guanábana (*Annona muricata* L.) muestreado in situ en el Pacífico y Norte de Nicaragua. *La Calera*, 4 (4): 29-35.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *Journal of Antibiotics*, 58: 1 - 26.
- Bobadilla, M., Zavala, F., Sisniegas, M., Zavaleta, G., Mostacero, J. y Taramona, L. 2005. Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus «guanábana» sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). *Revista Peruana de Biología*, 12 (1): 145-152.
- Boshler, H. D y Cordero, J. 2003. Árboles de Centroamérica un manual para extensionistas. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Oxford Forestry Institute (OFI). 1079 pp.
- Braga, S. R. 2014. Produção integrada de anonáceas no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36 (1): 102-107.
- Carrillo, F. J. A., García, E. R. S., Muy, R. M. D., Sañudo, B. A., Márquez, Z. I., Allende, M. R., de la Garza, R. Z., Patiño, V. M. y Galindo, F. E. 2005. Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su

- efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 23 (1): 24-32.
- Castillo, E. C. 2004. Efectividad de actinomicetos aislados de la rizósfera de papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*. Revista Mexicana de Fitopatología, 22 (2): 203-207.
- Castro, R. J 2007. Cultivo de la Anona (*Annona cherimola* Mill). Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica. 56 pp.
- Chavarría, M., Uribe, L. y Bolaños A. 2005. Microorganismos benéficos en el control de enfermedades en jengibre. Agronomía Costarricense, 29 (3): 145-155.
- Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). 2018. Consulta de Registros Sanitarios de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y LMR. Consultado en línea el 20 de diciembre de 2018 en <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2017. *Annona muricata* L. Consultado en línea el 20 de mayo de 2017 en http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/5-annon2m.pdf
- Costa, D. O. J. F., Assunção, P. I., Lima D. A. G. S., Muniz, S M. D. F. y Newman, L. N. E. D M. 2016. First report of *Phytophthora nicotianae* causing root rot of soursop in northeastern Brazil. Revista Brasileira de Fruticultura, 38 (3): 1-5.
- Dávila M. M. D., Gallegos, M. G., Hernández, C. F. D., Ochoa, F. Y. M. y Flores O. A. 2013. Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 4 (8): 1187-1196.
- De la Cruz, Q. R., Roussos, S., Rodríguez, H. R., Hernández, C. D. y Aguilera, C. N. 2018. Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. Karbala International Journal of Modern Science, 4 (2): 237-243.
- De Lima, P. R. E., Reis da S. I., Kassawara, M. M., Lúcio de A. J. y Magali de A. J. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 16 (5): 466-471.

- Evangelista, M. Z., Quiñones, A. E. E. y Rincón, E. G. 2017. Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 21 (63): 39-51.
- Ezziyani, M., Consuelo, P. S. C., Requena, M. E., Rubio, L. y Candela M. E. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, 26: 69-78.
- Gaviria, H. V., Patiño, H. L. F. y Saldarriaga, C. A. 2013. Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 14 (1): 67-75.
- Ghosh, S. y Chakraborty, N. (2012). *In vitro* biological control of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal organism of anthracnose of sarpagandha (*Rouloffia serpentina*). *Agriculture and Biology Journal of North America*, 3: 306-310.
- Guerrero, E. J. y Fischer, G. 2007. Manejo integrado en el cultivo de anón (*Annona squamosa* L.). *Revista colombiana de ciencias hortícolas*, 2 (1): 154-169.
- Guevara, P.E.B., Mejía, E.Z., León, M.T.C., Romero, I.L. y Alonso, J.G.G. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. y Sacc.] en papaya maradol roja (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22 (2): 198-205.
- Guillén, A. H., Gutiérrez, M., Lara, C. M.B.N., Chávez, T. A., Vidales, F. A., Ochoa S. y López, M. J. 2007. Antracnosis: una investigación sobre su agente causal en la franja aguacatera de Michoacán, México. *Actas VI Congreso Mundial del Aguacate*. Viña Del Mar, Chile. 12 - 16 Nov. 2007. ISBN No 978-956-17-0413-8.
- Hasani, A., Kariminik, A. y Issazadeh, K. 2014. *Streptomyces*: characteristics and their antimicrobial activities. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2 (1): 63-75.
- Hernández, F. L. M., R. Gómez J. y J. Andrés A. 2013. Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. *Libro Técnico Núm. 1. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit. México. 87 pp.*

- Hernández, V. L., Castillo, R. D. G., Chiquito, C. R. G., López, M. H., Ruiz B. R. y Vidal M. N. A. 2014a. La situación de las Annonaceae en México: principales plagas, enfermedades y su control. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36 (esp. 1): 44-54.
- Hernández, V. L., Martínez, N. A. V., Moctezuma, H. L., Rocha, D. G. C. y Contreras, R. G. C. 2014b. Propuesta de un plan de desarrollo integral del guanábano (*Annona muricata* L.) en el estado de Veracruz México. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36 (1): 94-101.
- Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H. y Fujii, Y. 2002. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, 61: 693-698.
- Hoyos, C. L., Duque, G. y Orduz, S. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 2 (1): 76-86.
- Huerta, P. G., Holguín, M. F., Benítez, C. F. A. y Toledo, A. J. 2009. Epidemiología de la antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] en mango (*Mangifera indica* L.) cv. ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 27 (2); 93-105. Recuperado en 21 de enero de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092009000200002&lng=es&tlng=es.
- Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista Protección Vegetal*, 24 (1): 14-21.
- Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT). 2011. Instructivo técnico para el cultivo de la guanábana. Ministerio de la Agricultura. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT). Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales (ACTAF). 16 pp.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). 2018. Guanábana. Consultado el 19 de Noviembre de 2018, en <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfruti/rguanabana>

- Juárez, B. G. P., López, M. A. y Sosa, M. M. E. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 4 (2): 14-23.
- Kim, P. I., Ryu, J., Kim, Y. H. y Chi, Y. T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20 (1): 138-145.
- Landero, V. N., Lara, V. F. M., Andrade, H. P., Aguilar, P. L. A. y Aguado, R. G. J. 2016. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7 (5): 1189-1198.
- Lima, F., Félix, C., Osório, N., Alves, A., Vitorino, R. y Domingues, P. 2016. Secretome analysis of *Trichoderma atroviride* T17 biocontrol of *Guignardia citricarpa*. *Biological Control*, 99: 38-46.
- Linu M. S. y Jisha M. S. 2017. *In vitro* control of *Colletotrichum capsici* induced chilli anthracnose by fungicides and biocontrol agent. *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture (IJAPSA)*, 3 (5): 27-33.
- López, F. U del C. Brito, V. H. López, M. D. Salaya, D J. M. y Gómez, M. E. 2017. Papel de *Trichoderma* en los sistemas agroforestales-cacaotal como un agente antagonico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20: 91-100
- Maughan, H. y Van der, Auwera. G. 2011. Bacillus taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, 11 (5): 789-797.
- Nava, D. C., Osada, K. S., Rendón, S. G. y Ayala, E. V. 2000. Organismos asociados a Hirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) en Michoacán, México. *Agrociencia*, 34 (2): 217-226.
- Okigbo, R. N. y Obire, O. 2009. Mycoflora and production of wine from fruits of soursop (*Annona muricata* L.). *International Journal of Wine Research*, 1: 1-9.
- Orozco, S. M., Medina, U. V. M., Robles, G. M., Orozco, R. J., Pérez, Z. O., Velázquez, M. J. J., Timmer, L. W. y Guzmán, G. S. 2006. Biología y manejo integrado de antracnosis del limón mexicano en el trópico seco de México. SAGARPA,

- INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Tecomán. Folleto Técnico Núm. 2. 73 p.
- Ortega, L. M., Gómez, S. y Arbelaez, G. 1994. Evaluación de *Streptomyces griseoviridis* (Mycostop) en el control de *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi, en dos variedades de clavel estándar bajo condiciones comerciales. *Agronomía colombiana*, 9 (1): 1-12.
- Peláez, A. A., de los Santos, V. S., Yépez, E. A., Parra, C. F. I. y Reyes, R. R. T. 2016. Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y Captan 50® contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7 (6): 1401-1412.
- Pérez, C. D. A., García, G. N. Y., Gallegos, M. G., Ruiz, C. M. F., Berlanga, R. D. I. y Ríos, V. C. 2015. Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagonistas a *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6 (7): 1629-1638.
- Pérez, L. G., Castillo, M. R., Chavarría, P. L., Brenes, A. A. y Gómez, A. L. 2015. Combate químico de la antracnosis de *Sansevieria trifasciata* var. Hahnii en un sistema de hojas separadas. *Agronomía Mesoamericana*, 26 (2): 305-313.
- Pinto, A. C. de Q., Cordeiro R. M. C., De Andrade M. S.R., Ferreira H. F., De Filgueiras A. H., Alves E. R. y Kinpara I. D. 2005. *Annona* species, Internacional Centre for Underutilised Crops (ICUC). University of Southampton, Southampton, UK 268 p.
- Qinggang Guo, Weixin Dong, Shezeng Li, Xiuyun Lu, Peipei Wang, Xiaoyun Zhang, Ye Wang y Ping Ma. 2014. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiological Research*, 169 (7-8): 533-540.
- Ramírez, A. y Pacheco de D. E. 2011. Composición química y compuestos bioactivos presentes en pulpas de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia*, Santiago, 36 (1): 71-75.
- Rincón, E. G., López, P. L. y Quiñones, A. E. E. 2014. Efectividad biológica *in vitro* de actinomicetos sobre el agente causal del tizón de halo en frijol. *Revista de Fitotecnia Mexicana*, 37 (3): 229-234.

- Rios, V. C., Caro, C. J. M., Berlanga, R. D. I., Ruiz, C. M. F., Ornelas, P. J. J., Salas, M. M. A., Villalobos, P. E. y Guerrero, P. V. M. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34 (1): 84-99.
- Robles, H. L., Hernández, H. J., González, F. A. C., Hernández, R. O. A., Núñez, B. A., y Pérez, L. R. 2015. *Streptomyces* PRIO41 como promotor de crecimiento en plantas de chile jalapeño y agente de control biológico de *Fusarium*. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 84: 253-261.
- Rodríguez, B. L. A. y Arredondo, B. H. C. 2007. Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México. 303 p.
- Rodríguez, D. A., Farrés, A. E., Fornaris, L. M., Hernández, E. D., Peña, G. O., Placeres, G. J., Mullen, L. y Ramos, J. 2010. Una mirada al manejo del cultivo de la guanábana (*Annona muricata* L.). *Revista Citri Frut.* 27 (1): 64-68.
- Rodríguez, L. E. S., González, P. J. M. y Mayek, P. N. 2009. La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27 (1): 53-63.
- Rodríguez, L. M. y Veneros, T. R. 2011. Control biológico de *Trichoderma harzianum* RIFAI sobre hongos patógenos de frutos postcosecha de *Carica papaya* procedente de zonas de distribución del distrito Trujillo (Perú). *Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas (REBIOL)*, 31 (2): 1-9.
- Rojo, F., Reynoso, M., Ferez, M., Chulze, S. y Torres, A. 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection*, 26 (4): 549-555.
- Rondón C. J. C. 1999. Estudio biológico y epidemiológico de la antracnosis, del tomate de árbol y generación de alternativas para su manejo integrado en Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA. Informe Técnico. Santafé de Bogotá, D. C. p.147.

- Rondón, A., Rondón, O. y Sanabría, A. N. 2006. Respuesta *in vitro* a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de mango. *Agronomía Tropical*, 56 (2): 219-235.
- Ruiz, A., Parra, C. C., da Graça, J. V., Salas, B., Malik, N. S. A. y Kunta, M. 2014. Caracterización molecular y de ensayos de patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*, agente causal de la antracnosis del limón en Texas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32: 52-61.
- Ruiz, C. M. F., Ríos, V. C., Berlanga, R. D. I., Ornelas, P. J. J., Acosta, M. C. H., Romo, C. A., Zamudio, F. P. B., Pérez, C. D. A., Salas, M. M. Á., Ibarra, R. J. E. y Fernández, P. S. P. 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35 (3): 437-462.
- Ruiz, S. E., Mejía, B. M. A., Cristóbal, A. J., Valencia, B. A. y Reyes, R. A. 2014. Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5 (7): 1325-1332.
- Sánchez, P. F. E. 2016. Importancia de los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* en el control biológico de enfermedades en cultivos de gran valor económico. *Bionatura*, 1 (3): 135-138.
- Sanmartín, N. P., López, X., Pemberthy, M. P., Granada, S. D. y Rueda, L. E. A. 2012. Análisis del modo de acción y de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *Revista Tumbaga*, 2 (7): 29-49.
- Santamaría, B. F., Díaz, P. R., Gutiérrez, A. O., Santamaría, F. J. y Larqué, S. A. 2011. Control de dos especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de papaya maradol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2 (5): 631-643.
- Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera (SIAP), 2017. Cierre de la producción agrícola por cultivo. En línea. Consultado el 27 de noviembre de 2018 en http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp.

- Tenorio, R. y Mollinedo, P. A. 2016. Inhibitory capacity of filtrates from *Trichoderma inhamatum* and *Caiophora andina* over phytopathogens of *Theobroma cacao*. *Revista Boliviana de Química*, 33 (3): 116-126.
- Trinidad, Á. E., Ascencio, V. F. De J., Ulloa, J. A., Ramírez, R. J. C., Ragazzo, S. J. A., Calderón, S. M. y Bautista, R. P. U. 2017. Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate de Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 19: 3953-3964.
- Vargas, H. H. A., Rueda, L. E. A. y Gilchrist, R. E. 2012. Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* (Fungi: Ascomycota) a diferentes temperaturas. *Actualidades Biológicas*, 34 (96): 103-112.
- Villacís, A. L. A., León, G. O., Santana, M. R., Mangui, T. J., Carranza, G. y Pazmiño, M. P. 2017. Actividad anti fúngica (*in vitro*) de extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum acutatum*). *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5 (1): 59-64.
- Villanueva, A. R., Cárdenas, S. E., Hernández, A. A. M., Mora, A. A. y Téliz, O. D. 2006. Patogénesis de la antracnosis (*Colletotrichum fragariae*) en frutos de chirimoya. *Agrociencia*, 40 (8): 773-782.
- Villanueva, A. R., Yáñez, M. M. J. y Hernández, A. A. M. 2008. Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Agrociencia*, 42 (6): 689-701.
- Villarreal, D. M. F., Villa, R. E. D., Cira, C. L. A., Estrada, A. M. I., Parra, C. F. I. y De los Santos, V. S. 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36 (1): 95-130.
- Weir, B. S., Johnston, P. R. y Damm, U. 2012. *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73 (1): 115- 180.
- Yamarte, M., Avilán, L., Marín, M., Rendiles, E., Tales, M. J., Solarte, J. y Maldonado, R. 2004. Fenología floral del guanábano (*Annona muricata* L.) injertado sobre combinaciones de patrones y a pie franco. *Revista Facultad de Agronomía*, 21 (1): 91-101.

- Yun Cao., Zihui Xu., Ning Ling., Yujuan Yuan., Xingming Yang., Lihua Chen., Biao Shen. y Qirong Shen. 2012. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Scientia Horticulturae*, 35: 32-39.
- Zakaria, L., Sahak, S., Zakaria, M. y Salleh, B. 2009. Characterisation of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of banana. *Tropical Life Sciences Research*, 20 (2): 119-125.
- Zavala, L. M. J., Tun, S. J. M., Cristóbal, A. J., Ruiz, S. E., Gutiérrez, A. O., Vázquez, C. M. y Méndez, G. R. 2005. Control postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11 (2): 251-255.